

UNIVERSIDAD DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS DOCTORAL

Observaciones citológicas sobre las opalinas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Dimas, Fernández-Galiano

Madrid, 2015

R.T. 438

BIBLIOTECA UCM



530475905X

595

OBSERVACIONES CITOLOGICAS

SOBRE

LAS OPALINAS*



FACULTAD CC. GEOLOGICAS
BIBLIOTECA

Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor en
Ciencias Naturales por el Licenciado Dimas Fernández-
Galiano Fernández

Madrid

Mayo de 1947

X-53-149161-6

INTRODUCCION

Entre los protozoos parásitos son tal vez los más fáciles de encontrar los llamados ~~corréntemente~~ opalinas, pues residen casi con absoluta constancia en el intestino recto y, principalmente, en la porción ciega rudimentaria del mismo, de muchísimos anfibios anuros, quizá de todos. Hállanse también, aunque con mucha menor frecuencia, en el intestino de anfibios urodelos y peces y hasta en alguna especie de reptil.

En las prácticas docentes de Zoología constituyen un precioso material de estudio porque pueden ser extraídos del cuerpo de su huésped sin dificultad alguna, conservados vivos durante muchas horas en un líquido indiferente y examinados al microscopio ~~si~~ necesidad de

fuertes aumentos por tener un tamaño relativamente grande.

Los primeros observadores de estos animales, que los clasificaron como pertenecientes al género Opalina, coincidieron en describirlos como infusorios con su cuerpo delimitado por una película provista de finos relieves y estructuras y protegida por un revestimiento ciliar uniforme. Si a estas circunstancias añadimos el hecho de que el cuerpo de las opalinas aparece claramente dividido en dos zonas, una interior o endoplásmática y otra exterior o ectoplásmática, y el de que carecen de orificio bucal, a nadie sorprenderá que el género Opalina quedase incluido antiguamente en el orden de los ciliados ~~Motricos~~ y, dentro de éste orden, en el suborden de los astomos. Más adelante, el antiguo género Opalina sirvió de base para establecer la familia Opalinidae, la cual subsiste y, como luego diremos, está integrada actualmente por varios géneros.

La falta de orificio bucal en las opalinas hace suponer que las materias nutritivas se incorporan a la masa protoplasmática del animal

penetrando en estado de disolución a través de la película por toda la superficie del cuerpo. Se ha emitido la hipótesis de que aquellos protozoos han perdido secundariamente la boya en virtud de un proceso de adaptación a la vida parasitaria, como acontece en muchos holotricos, los que en conjunto constituyen precisamente el suborden astomes. Si a tal hipótesis nos acogemos nos parecerá muy razonable la inclusión de los opalínidos en el citado suborden, de acuerdo con los antiguos protozoólogos.

Existe sin embargo en los opalínidos una particularidad morfológica que ha hecho dudar a muchos zoólogos de que aquellos animales sean verdaderos ciliados y que consiste en la presencia de núcleos de una sola clase, siempre en número plural. Como se sabe, es carácter general de los ciliados la posesión de macronúcleos y micronúcleos, que difieren entre sí, no sólo por la diversidad de su tamaño, sino también por su estructura y por su modo de división, amitótico en los primeros y mitótico

co en los segundos. Los núcleos de los opalínidos se comportan en este último respecto lo mismo que los micronúcleos de los ciliados comunes, pues también se dividen por mitosis, siquiera se distingan de ellos por ciertas singularidades estructurales.

Planteóse, pues, el problema de si los opalínidos son o no auténticos ciliados. Algunos autores han querido resolver esta cuestión de modo afirmativo, admitiendo, como más adelante veremos, que dichos protozoos poseen las dos clases de núcleos típicos de los ciliados. Otros han negado categóricamente la existencia de tal binuclearidad y, en consecuencia, no los estiman como verdaderos ciliados. En la actualidad, parece prevalecer la tendencia - aunque admitiendo la presencia de núcleos uniformes - de conservar a los opalínidos dentro de la clase de los ciliados, pero formando con ellos una subclase especial (Protociliata), en oposición a la subclase de los Euciliata, comprensiva de todos los restantes protozoos provistos de cilios vibrátiles.

No es esta singularidad relativa a los núcleos la única que ofrece el cuerpo de los opalínidos. Antes al contrario, estos protozoos, según diremos más adelante, ostentan pormenores de estructura que prestan a su estudio singular interés y que han sido objeto de numerosos trabajos, los cuales, sin embargo, no han alcanzado a dilucidar por completo los problemas que se propusieron resolver. Esta última circunstancia me ha animado a elegir como tema de mi tesis doctoral el estudio de los opalínidos desde el punto de vista morfológico, no pretendiendo abordar, claro está, los múltiples aspectos que el asunto presenta, sino solamente considerar algunos de los que me han parecido más interesantes.

El examen de la bibliografía que he tenido a mi disposición me ha persuadido de que los datos citológicos referentes a los opalínidos han sido revelados en su inmensa mayoría por los métodos a base de hematoxilina y, principalmente, por el de hematoxilina férrica de HEIDENHAIN. En la creencia de que la aplicación de los métodos de impregna-

ción metálica podría ser provechosa en este respecto, he ensayado de preferencia los argénticos y áuricos ideados por investigadores españoles, sin descuidar, naturalmente, la observación en vivo (con o sin colorantes vitales) y el empleo de otros métodos histológicos cuando lo he considerado de utilidad.

METCALF, en su valiosa monografía de la familia de los opalínicos, (37) se basa en el número de núcleos y en la forma del cuerpo para establecer la clasificación de aquellos animales. Con sujeción a este criterio, los divide en dos subfamilias, en las que los representantes de la primera (Protoopalininae) poseen dos núcleos y los de la segunda (Opalininae) numerosos núcleos. En cada una de estas subfamilias admite dos géneros, que los distingue por la forma del cuerpo; ésta es cilíndrica o fusiforme - de sección transversal circular en todo caso - en los géneros Protoopalina, de la subfamilia protoopalininos, y Cepedea, de la subfamilia opalininos; es en cambio aplastada - y, por consiguien-

te de sección transversal más o menos elipsoidal - en los géneros Galleriella y Opalina, pertenecientes, respectivamente, a las subfamilias proteopalíninos y opalíninos.

Mis observaciones han recaído principalmente sobre la especie Cepedea dimidiata (Stein), parásito de Rana esculenta, aun cuando no he dejado de utilizar como material de estudio, las pocas veces que he tenido ejemplares a mi disposición, la especie Proteopalina intestinalis (Stein), procedente del recto del sapo Discoglossus pictus.

OBSERVACIONES EN OPALINAS SOBRE FONDO OSCURO

En la bibliografía que me ha sido dable consultar no he encontrado ningún dato, de aplicación morfológica, referente a observaciones de opalinas con aparatos ultramicroscópicos, por lo cual he querido comenzar mi trabajo examinando ejemplares de la especie Cepedea dimidiata, procedentes del recto de Rana esculenta, con la ayuda de un condensador parabólico de fondo oscuro. Los excrementos del anfibio, entre los cuales viven las opalinas, han sido depositados sobre un portaobjetos mezclados con unas gotas de solución acuosa de cloruro sódico al 6,5 por 100 y protegidos por un cubreobjetos.

En estas condiciones, el endoplasma del animal vivo, observado sobre fondo oscuro, aparece de color grisáceo y casi transparente, rom-

piendo la uniformidad de su aspecto únicamente la presencia de granulaciones pequeñísimas (microsomas), que se destacan en blanco sobre la masa gris; el ectoplasma, en cambio, se muestra completamente exento de gránulos y, por tanto, ópticamente vacío.

Al principio, los infusorios nadan normalmente en todas direcciones, pero al cabo de algunos minutos van acumulándose en la zona periférica de la preparación; sin embargo, a poca distancia del borde de ésta quedan inmóviles casi repentinamente. La acumulación en la zona periférica es debida, indudablemente, a un fenómeno quimotáctico (aerotaxis positiva), puesto que el contenido de la preparación está en contacto con el aire atmosférico; ahora bien, en los bordes de la preparación, a causa de la evaporación del agua, aumenta la concentración salina de la solución, y éste hecho, unido a la acción quimotáctica, determina la inmovilización y estacionamiento de las opalinas en la citada zona marginal. En cambio, los individuos que permanecen en la región

central - muchos de ellos aprisionados por las partículas de excremento de la rana - siguen viviendo en un medio de menor concentración salina y ejecutando sus movimientos de locomoción de manera normal.

En los animales que se han acumulado en la zona periférica, los cilios vibran cada vez con mayor lentitud, hasta cesar por completo sus movimientos. En cuanto los cilios quedan inmóviles - y a veces antes de llegar este momento - comienza el proceso de coagulación del endoplasma formándose gránulos pequeñísimos (casi imperceptibles con un aumento de 450 diámetros) que dan a aquella región citoplasmática un aspecto blanquecino, más intenso en una zona que abarca casi la mitad anterior del cuerpo. También los cilios pierden su primitiva transparencia y se tornan blancos; por debajo de las filas de cilios se ven sendas líneas, también de color blanco, integradas por gránulos finísimos.

Durante el proceso de coagulación del protoplasma, la forma de la célula no cambia, o lo hace muy ligeramente. Los cilios se van

desprendiende poco a poco y al cabo de algún rato (una media hora) la opalina queda totalmente desprovista de ellos. Entre tanto, aumenta el número de gránulos de coagulación y los núcleos empiezan a hacerse visibles en forma de círculos blanquecinos, con diminutos gránulos en su interior. El ectoplasma ha perdido su transparencia primitiva, pero conserva su aspecto homogéneo por no haberse formado en él gránulos de coagulación.

Al cabo de una hora, el aspecto del ectoplasma sigue siendo el mismo, pero el endoplasma está cuajado de gránulos blancos, tan numerosos que casi no dejan ver los núcleos. El contorno de los infusorios permanece sin deformación ostensible, si bien en algunos se producen grietas o roturas en la periferia. Cuando ha transcurrido más de una hora desde la muerte de los individuos de la zona externa de la preparación, los refugiados en la parte central aún están vivos y mueven sus cilios; ello significa, a mi entender, que el agente determinante

de la muerte de los individuos periféricos es el aumento de la concentración del cloruro sódico en el líquido, debido a la evaporación del agua en los bordes de la preparación, y no la escasez o falta de oxígeno, puesto que, lógicamente pensando, este gas debe de hallarse disuelto en mayor cantidad en los bordes de la preparación, en inmediato contacto con el aire atmosférico, que en la porción central de la misma.

LA PELICULA

El cuerpo de las opalinas, a semejanza de lo que acontece en los restantes protozoos, está revestido de una película que se adhiere íntimamente al ectoplasma y cuya estructura ha sido objeto de vivas discusiones por parte de los numerosos investigadores que se han dedicado a su estudio.

El primero que se ocupó de la membrana exterior del cuerpo de estos animales fué ZELLER (62), quien, a la vista de ejemplares de Opalina ranarum, la consideró como un conjunto de bandas de naturaleza muscular de 3 a 4,5 μ de anchura, que, unidas estrechamente unas a otras, forman un revestimiento continuo al cuerpo del protozoo, sin que éste posea ninguna otra formación tegumentaria. Demostraríase la existencia real

de tales bandas sometiendo la opalina a la acción del ácido acético diluido, con lo cual aquéllas se separan más o menos completamente en ciertos parajes superficiales. BÜTSCHLI (8), aludiendo a esta membrana así interpretada por ZELLER, la estima equivalente a lo que comúnmente se denomina cutícula en los infusorios y niega que en ella existan micronemas. KÖLSCH (27) declara no haber observado en Opalina ranarum ni en Cepedea disidiata movimientos que pudieran interpretarse como resultado de contracciones musculares cuando sometía a dichos ciliados a la acción de corrientes galvánicas, lo que, a mi juicio, constituye un argumento en contra de la existencia de las bandas musculosas de ZELLER.

TÖNNIGES (55),⁽¹⁾ que también se ocupó de la película de Opalina

(1) No me ha sido posible consultar las publicaciones de este autor, por lo cual tomo las referencias a ellas de los trabajos de otros autores.

ranarum, habla de unas delicadísimas fibrillas que se entrecruzan inmediatamente por debajo de aquélla y de cuyos puntos de cruce arrancan

los cilios; la contracción de dichas fibrillas determinaría el movimiento ciliar. MAIER (35), en el curso de sus estudios sobre el aparato ciliar de algunos infusorios, declara, aludiendo a Opalina ranarum, que él no ha podido convencerse de la realidad de las fibrillas observadas por TÖNNIGES; afirma, además, que en la película existen surcos longitudinales, en los que se implantan los cilios, atravesando éstos una parte del ectoplasma después de haber nacido en los corpúsculos basales; las "bandas musculosas" de ZELLER corresponderían a los espacios que median entre dichos surcos, los cuales aparecen, a su vez, rayados longitudinalmente por la presencia de otros surcos paralelos a las filas de cilios; estos últimos surcos, en número de dos o tres en cada espacio interciliar, quedan separados entre sí por tres o cuatro costillas o crestas dotadas de una finísima estriación transversal, o sea, un conjunto de delgadísimas líneas transversales paralelas entre sí y muy próximas unas a otras.

KUNSTLER (31) describe la película de Cepedea dimidiata como una membrana de naturaleza cuticular provista de pequeños abultamientos de los cuales nacen los cilios.

En su Memoria sobre Opalina, METCALF (36), basándose en el estudio de preparaciones fijadas y teñidas de algunas especies, confirma esencialmente los hallazgos de TÖNNIGES al afirmar la existencia de dos series de fibrillas perpendiculares entre sí, situadas debajo de la película y que se entrecruzan a la altura de los gránulos basales de los cilios, pasando las fibrillas longitudinales por encima de los gránulos y tangencialmente a ellos y las transversales a un nivel un poco inferior. Tal vez estas fibras transversales observadas por METCALF puedan ser identificadas con las estrías transversales que, según MAIER, cruzan perpendicularmente las costillas longitudinales; tienen, en efecto, un aspecto muy parecido y análoga ubicación topográfica, excepto por lo que se refiere al nivel que ocupan, pues METCALF dice explícitamente que sus

fibrillas transversales se hallan debajo de la película y no en ésta.

No obstante la semejanza de las imágenes observadas por TÖNNIGES con las vistas por METCALF, la interpretación fisiológica de éste difiere de la de aquél, pues METCALF (36) supone que las fibrillas por él observadas intervienen en la coordinación del movimiento de los cilios, y en un trabajo posterior (37) considera la red fibrilar como un sistema nervioso rudimentario comparable al mucho más desarrollado que existe en numerosos ciliados y flagelados. El propio investigador niega la existencia de bandas musculares en la superficie de la opalina, creyendo probable que los pretendidos mionemas que ZELLER ha visto aparecer bajo la acción del ácido acético diluido son tiras de película aisladas entre las filas de cilios.

La observación de opalinas (Opalina ranarum, Cepedea dimidiata) en vivo sugirió a KONSULOFF (28) la idea de que los movimientos giratorios y deformatorios de aquellos animales presuponen la presencia de mionemas en la película, los que, según afirma, ha llegado a ver en preparaciones

teñidas por el carmín borácico y por la hematoxilina. No obstante, a ~~esta~~ diferencia de ZELLER, que considera cada espacio entre dos filas de ~~di-~~lios ocupado por una unidad muscular ("mionema"), KONSULOFF cree que en cada uno de estos espacios reside un paquete de mionemas y que cada mionema estaría representado por una costilla longitudinal de las que vió MAIER separadas entre sí por surcos longitudinales. Dichos surcos y costillas se harían visibles sobre todo cuando los mionemas se hallan en estado de relajación, pues en el de contracción se harían más compactos los paquetes de mionemas, apretándose sus mionemas componentes unos contra otros y, por consiguiente, haciendo desaparecer los surcos.

En cuanto a la estriación transversal que, según MAIER, presentan las costillas (mionemas de KONSULOFF), sería debida, en opinión de este último autor, a un efecto óptico provocado por el enfoque simultáneo de los mionemas, que no están estriados, y de la membrana, subyacente a esta capa y efectivamente dotada de una estriación transversal. Un enfoque cuidadoso nos mostraría sucesivamente, al decir de KONSULOFF, pro-

cediendo de fuera a dentro del ejemplar, la capa de mionemas no es estriados y la membrana estriada transversalmente.

GOURVITSCH (17) niega la existencia de mionemas en la película de Opalina elongata, especie descubierta por este autor en el intestino de ranas asiáticas.

Las imágenes de la película observadas por TEN KATE (54) en Opalina ranarum son, según este autor, análogas a las que figuran en los trabajos de MAIER y de KONSULOFF, pero les da una interpretación diferente, pues no cree en la existencia de los mionemas a que se refiere KONSULOFF. En efecto, la película estaría recorrida por una serie de bandas longitudinales que representarían costillas o eminencias de la misma: unas más altas, que corresponderían a los surcos ciliares de MAIER, y otras más bajas, las que KONSULOFF habría tomado equivocadamente por mionemas; así, pues, los cilios no arrancarían de surcos, sino de las costillas altas, debajo de las cuales residirían también los gránulos basales. En cuanto a las estrias transversales de MAIER,

TEN KATE se inclina a considerarlas, al igual que TÖNNIGES y METCALF, como componentes de una red de fibrillas subyacentes a la película.

VAN OVERBEEK DE MEYER (60) considera la película de Opalina rana-
rum como formada por una delgada capa superficial del ectoplasma, en la que se distinguen las costillas longitudinales ya señaladas por MAIER, si bien su número no sería constante, sino que dependería de la edad del animal, del crecimiento del mismo y de la división previa a la formación de quistes; los cilios nacerían en gránulos basales situados en surcos y atravesarían la película para emerger al exterior. El mencionado autor rechaza la idea de que exista una red que une entre sí los gránulos basales de los cilios; para él, habría solamente una serie de fibrillas longitudinales, paralelas a las filas ciliares y coincidentes con éstas; en el trayecto de tales fibras nacerían, en forma de diminutos engrosamientos, los gránulos basales. Con respecto a los componentes transversales de la red admitida por TÖNNIGES, METCALF y TEN KATE, los estima como diferenciaciones lineares en cuyo

trayecto se forman gránulos de naturaleza lípide; hallaríanse interrumpidos al nivel de las filas longitudinales de gránulos basales, de modo que éstas quedan en medio de tiras longitudinales de protoplasma indiferenciado, en las cuáles surgirían las series lineares de gránulos lípides.

Para el estudio de las formaciones peliculares y subpeliculares en Cepedea dimidiata he llevado a cabo observaciones en individuos vivos y en preparaciones teñidas por el método de coloración con carbonato de plata piridinado, de RIO-HORTEGA (47), unas veces según la fórmula original y otras doblando la cantidad de piridina.

Observando en vivo las opalinas, en una gota de líquido de Ringer, especialmente aquéllas moribundas que, por la lentitud de sus movimientos ofrecen un buen material para el estudio de la película, he visto con frecuencia, a la perfección, las filas de corpúsculos basales, de cada uno de los cuáles nace un largo cilio, y entre cada dos de ellas

se divisa un campo cuadrículado. Pero este cuadrículado ~~disparece~~ ~~se~~ en lugar de enfocar exactamente la película enfocamos un plano superior o un plano inferior, pues entonces se muestran, ya las bandas longitudinales descritas primeramente por MAIER, ya aquellas otras transversales que, según este mismo autor, atraviesan perpendicularmente las longitudinales. Así, pues, estoy de acuerdo con KONSULOFF en que las líneas transversales no se hallan en el mismo plano que las longitudinales, pero advirtiéndole que el número de las longitudinales que existen entre cada dos filas de cilios, que KONSULOFF afirma ser de tres o cuatro en Opalina ranarum, en mis ejemplares de Cepedea se eleva con frecuencia a ocho, diez, doce o más. En individuos vivos no he logrado ver otra clase de formaciones peliculares.

He examinado también, como antes queda indicado, ejemplares de Cepedea dimidiata coloreados por el método del carbonato de plata piridinado de RIO-MORTEGA, previa la extensión del excremento de la rana sobre un cubreobjetos y fijación del material en solución acuosa de

formol al 10 por 100 durante un tiempo que, en general, no ha bajado de 24 horas. La fijación más prolongada (varios días y aun semanas) no menoscaba, al parecer, la eficacia de la tinción por dicho método.

Los resultados que se obtienen varían según la cantidad de piridina que se añade a la solución de carbonato de plata. Empleando el método en su fórmula original (una gota de piridina por centímetro cúbico de solución argéntica) lógranse espléndidas tinciones de gránulos basales de oílios y se ve que entre las filas de éstos (fig. 1) la película presenta dos tonos de color diferentes; en efecto, en el espacio comprendido entre dos filas de gránulos, la faja central es de un matiz notablemente más oscuro que el resto, de donde resulta que cada fila de gránulos basales forma la línea central de una estrecha banda protoplasmática de tono más claro. Precisamente en la banda oscura, y teñidas de un color ligeramente más intenso, se extienden, paralelamente a las filas de gránulos basales, las formaciones que MAIER interpretó como surcos de la película; en estas preparaciones son invisibles las lí-

neas transversales que vieron MAIER y KONSULOFF, por lo que no se puede determinar si yacen en la membrana, debajo de las costillas longitudinales, como supone KONSULOFF, o, por el contrario, son estriaciones transversales de estas costillas, según prefiere MAIER.

Utilizando la fórmula del carbonato de plata piridinado con doble cantidad de piridina se hacen visibles, en cambio, las líneas transversales de MAIER, pero no las costillas longitudinales. Aparecen aquéllas a modo de finas estriaciones de la membrana con una coloración débil que contrasta con la muy intensa que toman las fibras longitudinales subyacentes a las filas de gránulos -de las que más adelante hablaré-, lo cual confiere a unas y otras un aspecto tan diferente que me impide sumarme a la opinión de TONNIGES, METCALF y TEN KATE, quienes, según sabemos, interpretan las primeras como fibras auténticas; el hecho de que las líneas transversales sean perfectamente visibles en vivo constituye, a mi modo de ver, un argumento en contra de su naturaleza fibrilar.

Interesa hacer constar que en mis preparaciones se ve claramente cómo las líneas transversales de MAIER unen entre sí los gránulos basales, llegan a ponerse en contacto con éstos y no terminando a cierta distancia de ellos, según afirma VAN OVERBEEK DE MEYER, por lo menos tratándose de opalinas adultas⁽¹⁾.

(1) Mis observaciones no me han permitido dilucidar si los gránulos basales de los cilios residen en cumbres, como afirma TEN KATE, o en valles, como sostienen los demás autores, pero es indudable que se encuentran -conforme demostraré al hablar del retículo endocelular- en posición externa con respecto a las fibras subpelículaes principales (v. pág.39) y, por consiguiente, en la película, no en el ectoplasma.

Esencial para el conocimiento de la estructura de la membrana es determinar si en ella existen o no existen mionemas. Yo hubiera querido pronunciarme por uno de los dos términos del dilema, pero las imágenes observadas por mí no me lo permiten, puesto que si, por una parte, las que yo he contemplado de la película en el animal vivo coinciden con las descritas por KONSULOFF, no me ha sido posible, como ya he hecho constar, comprobarlas en las preparaciones teñidas, por lo cual no me

puedo convencer de que, en efecto, las porciones peliculares longitudinalmente estriadas sean mionemas y estén situadas por encima de las líneas transversales de MAIER.

Por no haber empleado métodos de coloración adecuados no he llegado a ver los gránulos lipoides que, según VAN OVERBEEK DE MEYER, existen en la película.

Las filas de gránulos basales de los cilios se extienden en Cepe-
dea dimidiata paralelamente entre sí de uno a otro extremo del cuerpo. En el extremo anterior del animal existe una acumulación lineal de gránulos basales, ^{en la} que podemos denominar línea de sutura (fig. 2), donde los referidos gránulos no están distribuidos de un modo regular, sino agrupados para formar un conjunto alargado con sus extremos ~~adilgaza-~~dos, hasta el punto de que en éstos están ordenados los gránulos en serie moniliforme. La línea de sutura recorre la convexidad del extremo anterior de la opalina, pasando por el ápice de aquélla y descendiendo algo más por el lado menos convexo del cuerpo; hállese situada en un

plano que divide idealmente el cuerpo del protozoo en dos partes sinótricas.

De ambos lados de la línea de sutura parten las filas de gránulos basales en sentido normal a aquélla, pero en seguida se arquean para tomar una dirección aproximadamente longitudinal y corren paralelamente unas a otras (fig. 2, F, F'); las citadas filas no siguen las generatrices del cuerpo de la opalina (considerando ésta esquemáticamente como un sólido de revolución), sino que se retuercen un poco en forma helicoidal, hasta llegar al extremo posterior del cuerpo, donde se juntan todas en una región apical.

Las filas de gránulos basales que continúan por uno y otro lado la línea de sutura corren siempre paralelas a sus congéneres; como ya sabemos, dada la posición que ocupa aquella línea, nacen en puntos diametralmente opuestos y conservan esa oposición diametral durante todo su trayecto. Podemos, pues, considerarlas como líneas determinantes de una superficie sagital, que no es plana, puesto que tiende a arrollarse

helicoidalmente. No es, pues, la simetría de Cepedea dimidiata exactamente comparable a la de un vertebrado, por ejemplo, sino más bien a la de un molusco gasterópodo, cuya masa visceral, como es sabido, ha experimentado una torsión alrededor de su eje. Las dos porciones simétricas del cuerpo de la opalina lo son con respecto a dicha superficie y, como es natural, también tienden a arrollarse en forma helicoidal.

El esquema de la figura 3 representa un ejemplar de Cepedea dimidiata que hubiese sido cortado según la superficie sagital y cuyas mitades hubieran sido separadas; la parte que queda en blanco (sin filas de gránulos basales) corresponde a la superficie sagital. El de la figura 4 simboliza la película de una de estas mitades del animal, la cual aparece rectificadas idealmente sobre un plano a fin de que se vean con claridad las filas de gránulos basales de los cilios.

Conforme muestran las figuras 2, 3 y 4, en Cepedea dimidiata hay un cierto número de filas de gránulos basales (E') que arrancan de la línea de sutura pero no se prolongan hasta el extremo posterior del cuer-

po, cosa que ya había observado METCALF (37) en Protoopalina intestinalis y en alguna otra especie. También VAN OVERBEEK DE MEYER vió formaciones análogas a éstas en Opalina ranarum y las interpretó como filas en vías de crecimiento; es decir, que en ellas irían formándose nuevos gránulos basales a continuación de los ya existentes ⁽¹⁾.

(1) Por cierto que en 1936 vió la luz un trabajo de CHATTON y BRACHON (11) en el que estos autores, sin tener en cuenta las observaciones anteriores de METCALF y VAN OVERBEEK DE MEYER, afirman haber sido los primeros en señalar la existencia de filas de gránulos basales que no se prolongan hasta el extremo posterior del cuerpo de Opalina ranarum.

EL RETICULO ENDOCELULAR

SCHNEIDER (50) fué el primero que demostró la existencia, en el protoplasma de Opalina ranarum, de una trama o armazón formada por delicadas fibrillas que cruzan el cuerpo del animal en todas direcciones. De las fibrillas componentes de este armazón o retículo, a las que el citado autor atribuye una función de sostén, unas son relativamente gruesas, en contraste con otras más finas que ocupan una posición superficial; estas últimas recorrerían la capa ectoplasmática y se perderían luego en el endoplasma. Las fibras más sutiles entrarían en conexión con los gránulos basales de los cilios; por otra parte, los núcleos y las esférulas existentes en el endoplasma (v. pág. 81) estarían sujetos a los hilos de la red.

KONSULOFF (28) confirma el descubrimiento de SCHNEIDER en Opalina ranarum y encuentra un retículo análogo en Cepedea dimidiata; en una y

otra especie comprueba que las fibrillas de la red se extienden por el cuerpo entero del animal en todas direcciones, pero orientándose principalmente en sentido perpendicular a la película en aquellos lugares en que esta membrana se retrae (por acción de los mionemas que dicho autor admite), pues entonces ejerce una tracción sobre aquellos filamentos. No ha podido comprobar que existan conexiones directas entre las fibrillas en cuestión y los gránulos basales de los cilios y tampoco halla relación alguna entre el retículo por un lado y los núcleos y esférulas del endoplasma por otro. En cuanto a la significación funcional del retículo, KONSULOFF le atribuye la misión de conservar la forma normal del cuerpo de la opalina a despecho de las posibles deformaciones originadas en éste a consecuencia de la contracción de los mionemas.

También TEN KATE (54) ha llevado a cabo el estudio del sistema fibrilar en Opalina rhabarum, a base de coloraciones con hematoxilina férrica, hematoxilina DELAFIELD y método de GIEMSA. El mencionado autor

ha englobado en el mismo concepto de sistema fibrilar intraprotoplásmático y ha considerado como unidad morfológica y fisiológica, no solo el conjunto de fibrillas estudiado por SCHNEIDER y KONSULOFF, sino también las formaciones subpeliculares que fueron descubiertas a fines del pasado siglo por TÖNNIGES (55), a las cuales me he referido con anterioridad (v. pág. 14). Estas estructuras han sido objeto de variada interpretación, pero siempre fueron consideradas como elementos relacionados únicamente con la película.

Por consiguiente, estima como constitutivas del sistema fibrilar:

- a) en la capa subpelicular, las fibras que forman parte de la red estudiada por TÖNNIGES y METCALF y otras que forman ángulo de 60° con las filas de cilios; b) en el ectoplasma, ciertas fibras paralelas a la superficie y otras, perpendiculares a ellas, que las unen con los gránulos basales; c) en el endoplasma, unas fibras, gruesas y delgadas, que lo recorren en todas direcciones y otras (fibras dorsoventrales) que, o bien se extienden diametralmente de una cara plana a la opuesta, conec-

tando entre sí dos gránulos basales, o bien forman nidos o redes alrededor de los núcleos. En cuanto al papel funcional de las citadas fibras, TEN KATE se adhiere a la interpretación mecánica de SCHNEIDER y KONSULOFF, rechazando, en cambio, las ideas de MATCALF relativas a la red subpelicular, según las cuales, ésta representaría una especie de sistema nervioso rudimentario destinado a coordinar los movimientos de los cilios (v. pág. 17).

De las descripciones y figuras del trabajo de TEN KATE se deduce que los elementos componentes del "sistema fibrilar" de este autor no llegarían a constituir un verdadero retículo como el imaginado por los investigadores anteriores, puesto que las distintas fibras por aquél enumeradas y descritas hallaríanse, en general, bastante independientes unas de otras.

Al decir de VAN OVERBEEK DE MEYER (60), el sistema fibrilar de Opalina ranarum es una red orientada en sentido dorsoventral, en la cual, vista en una sección del cuerpo perpendicular a las caras apla-

nadas del mismo, podemos comprobar la existencia de una zona que ocupa la parte central del endoplasma, provista de mallas anchas, y dos zonas laterales, de mallas estrechas, situadas respectivamente debajo de la película de cada una de las caras aplanadas; con la red de mallas estrechas estarían unidas los gránulos basales de los cilios mediante fibras sencillas o compuestas; también las raíces ciliares se continuarían directamente o previa fusión entre sí con la citada red de mallas anchas. En las mismas secciones perpendiculares a las caras aplanadas de la opalina se puede observar también que la zona central de mallas anchas se une con las zonas laterales de mallas estrechas a favor de fibras que siguen un curso dorsoventral. Así, pues, en todo el cuerpo del animal existiría un verdadero retículo, y no solo alrededor de los núcleos, como creyó TEN KATE.

Está convencido VAN OVERBEEK DE MEYER de que el sistema fibrilar de Opalina ranarum es una formación transitoria, existente tan solo en los individuos jóvenes; a su modo de ver, el hecho de que varios in-

investigadores no hayan llegado a verlo dependería de haber estudiado solamente ejemplares adultos. Afirma que en las opalinas muy jóvenes aparecen los primeros indicios de fibrillas en forma de gránulos dispuestos en serie moniliforme orientada en sentido dorsoventral; a continuación, estas filas de gránulos se ordenarían en forma de Φ red, luego tomarían aspecto de fibras por desaparición de los gránulos. Después, cuando las opalinas se aproximan a la fase adulta, van desapareciendo las formaciones reticulares, persistiendo únicamente las fibras dorsoventrales, y por último, en los individuos adultos, también éstas llegan a desaparecer.

VALKANOV (58), en ejemplares de Copesthes dimidiata fijados por el líquido de Flemming y coloreados por hematoxilina férrica, ha observado fibras análogas a las dorsoventrales que VAN OVERBEEK DE MEYER vió en O. ranarum y expresa su opinión, que, como luego veremos, coincide con la mía, de que las características de simetría en las distintas especies de opalinas se hallan en relación con la to-

pografía del sistema de fibras, ya que en la especie C. dimidiata están dispuestas en forma radial las fibras que VAN OVERBEEK DE MEYER califica de dorsoventrales en C. ranarum. Observó también claramente, coincidiendo con el dictamen de VAN OVERBEEK DE MEYER y disintiendo de la opinión de KONSULOFF, que estas fibras radiales están unidas a los gránulos basales de los oclios, de lo cual aporta como prueba la imagen de una sección transversal de un ejemplar de C. dimidiata.

PATTEN (39), cuyo trabajo no he podido consultar, pero sí las reseñas del mismo publicadas en las revistas "Biological Abstracts" (marzo de 1937) y "Zoologischer Bericht" (1934), describe un retículo en las opalinas, pero ignoro, a causa de la concisión de las citadas referencias, las características que le atribuye dicha autora.

He tratado de teñir el retículo de Cepedea dimidiata aplicando diversos procedimientos de coloración a ejemplares extendidos

junto con el excremento de la rana, en cubreobjetos y fijados en líquidos idóneos. Mis primeros ensayos fueron hechos con el método de la hematoxilina ferro-acética de E. FERNÁNDEZ GALIANO (14), previa fijación en líquido de ZENKER, y con el de la plata reducida de CAJAL (43), empleando la mezcla de formol y nitrato de urano para fijar el material, y aunque una y otra coloración permiten vislumbrar el sistema fibrilar, no se llega a ver éste, ni mucho menos, con la perfección y finura con que lo revela el proceder del carbonato de plata piridinado de RIO-HORTEGA (47), del que ya he hablado con ocasión del estudio de la película. Sin embargo, para obtener una impregnación selectiva del retículo es indispensable aumentar la cantidad de piridina, pues si la concentración de ésta no rebasa la de una gota por centímetro cúbico de solución argéntica (conforme propone el autor del método) no llegan a impregnarse bien las fibras reticulares. Aun cuando el método es algo inconstante, es posible lograr en la mayoría de los casos espléndidas impregnaciones añadiendo dos

gotas de piridina por cada centímetro cúbico de solución argéntica.

El retículo no es igualmente argentófilo en toda su extensión, pues se impregnan con mayor intensidad las regiones del mismo correspondientes a ambos extremos del cuerpo, especialmente del anterior, por lo cual es forzoso en ocasiones intensificar en exceso la coloración de los extremos para que las porciones reticulares centrales se distingan con la debida claridad.

No tengo suficientes elementos de juicio para corroborar ni para impugnar la opinión, expresada por VAN OVERBEEK DE MEYER (60) de que el retículo es una formación transitoria, existente tan solo en las formas juveniles de opalinas. Unicamente deseo hacer constar que he encontrado en ejemplares de Cepedea dimidiata que, a juzgar por los rasgos de su morfología general, me parecieron hallarse en la fase adulta.

Según mis observaciones, la estructura del retículo en cuestión,

tal como se ve en una opalina (Ce pidea dimidiata) no deformada, se puede entender como sigue:

En la zona más externa del ectoplasma, es decir, inmediatamente debajo de la película, se hallan unas fibras relativamente gruesas que se extienden exactamente por debajo de las filas de los gránulos basales de los cilios (fig. 5, SP); tales fibras, que denominaré en lo sucesivo fibras subpeliculares principales, fueron ya observadas por TÖNNIGES (55), METCALF (36), TAN KATE (54) y VAN OVERBEEK DE MEYER (60), en Opalina ranarum.

En un trabajo publicado en 1926 describe KLEIN (25) un sistema de líneas que aparecen en la superficie de los ciliados (Opalina ranarum entre ellos) tratados por cierto método de impregnación a base de nitrato de plata y a las cuáles designa con el nombre de "Silberlinien"; procederían, según manifiesta el propio KLEIN en una publicación posterior (26), de una diferenciación del ectoplasma. La figura 23 del primero de los citados trabajos reproduce el aspecto de un trozo

de la superficie de O. ranarum coloreado por el citado método y en ella aparecen las Silberlinien en forma de estrechas bandas que yacen inmediatamente debajo de las filas de gránulos basales de los cilios y siguen exactamente la dirección de ellas. Dada la posición de estas líneas argénticas, no puedo menos de pensar que se trata de las mismas formaciones que ahora voy a describir con el nombre de fibras subpeliculares principales.

En mis preparaciones se ve que una de las fibras subpeliculares principales alcanza un grosor bastante mayor que las restantes (figura 5, SS) y se prolonga por debajo de la que conocemos con el nombre de línea de sutura, describiendo, por tanto, una curva que, aproximadamente, es un arco de elipse en la posición de máxima curvatura. Esta robusta fibra, que llamaré fibra subsutural, constituye una a modo de viga maestra del sistema de filamentos subpeliculares, pues de ella arrancan las demás fibras; éstas, en efecto (fig. 5, SP), emergen de la fibra subsutural a uno y otro lado de la misma y en senti-

do normal a ella, corren paralelas entre sí y se dirigen hacia el polo posterior del animal.

Las fibras subpeliculares principales están en inmediato contacto con las filas de gránulos basales de los cilios, de tal manera que en la mayoría de los casos se confunden y no son visibles separadamente. Creo que entre ambas formaciones existe una relación genética, puesto que de dichas fibras, muchas se prolongan hasta el mismo polo posterior del cuerpo, donde confluyen, mientras que otras se interrumpen a mayor o menor distancia de su punto de emergencia de la fibra subsutural (fig.5); ahora bien, las mismas diferencias de longitud se notan en las filas de gránulos basales que se hallan superpuestas a los citados filamentos.

No obstante, los gránulos basales no están soldados, ni siquiera adheridos, a las fibras subpeliculares principales, lo que se advierte con el simple examen de las figuras 6,7 y 8. En esta última está representado un fragmento de una opalina que ha sido desgarrada

parcialmente por las agujas en el sentido que señala la flecha. Pues bien, aquí se ve con claridad que la aguja ha separado en algunos puntos las filas de gránulos basales de las fibras subpeliculares subyacentes, sin que la ordenación lineal de aquéllos se haya descompuesto en lo más mínimo. Ello prueba de un modo evidente que no existe soldadura ni adherencia entre ambas formaciones, pues si así ocurriera, las filas de gránulos basales no hubieran podido quedar separadas de las fibras correspondientes. Exactamente lo mismo se aprecia en diversos puntos de la figura 6 y también en la figura 7, en donde se notan discordancias considerables entre las fibras subpeliculares principales y las filas de gránulos basales, pero no dándose nunca el caso de que un gránulo quede fuera de su alineación por haber permanecido unido a la fibra.

A primera vista parecen hallarse en pugna con lo que acabo de decir las características de la figura 9, representativa de un individuo de C. dividiata que, fuertemente distendido por las agujas du-

rante las maniobras de la preparación, ha terminado por romperse; como consecuencia de la distensión, los gránulos basales de los cilios se han separado ostensiblemente unos de otros dentro de cada fila, como puede comprobarse comparando los que están en la porción más afectada por la distensión con los que se hallan en la parte no distendida (la más próxima al extremo del ejemplar). Es evidente que las fibras subpeliculares principales se han distendido a causa de la tracción de las agujas y podría creerse que los gránulos basales, en el supuesto de que estuvieran soldados con aquéllas, han quedado más separados entre sí sencillamente por haberlos arrastrado las fibras durante su estiramiento. Pero como no es menos evidente, dada la gran plasticidad del protoplasma constitutivo de la película, que también éste ha experimentado una cierta distensión, basta, para explicar la separación de los citados corpúsculos, admitir que han sido arrastrados por la porción protoplasmática que les sirve de substrato al efectuarse el estiramiento de ésta, lo cual, naturalmente, no es no-

tivo para hacer perder a los gránulos su normal ordenación lineal.

Entre las fibras subpeliculares principales existen unos filamentos, muy finos por regla general, que distinguiré con el nombre de fibras subpeliculares secundarias, las cuales se anastomosan unas con otras de modo variado y se conectan también con las fibras subpeliculares principales, de suerte que constituyen en conjunto una red sutil y de mallas muy irregulares (fig. 10). Mis fibras subpeliculares secundarias no tienen nada que ver con la estriación transversal de MAIER, aun en el supuesto de que ésta representase un sistema de fibrillas delgadas que conectan entre sí las filas de corpúsculos basales de los cilios, conforme admiten TÖNNIGES, METCALF y TEN KATE, puesto que tales fibras transversales muestran un paralelismo perfecto entre sí, hallándose regularmente dispuestas entre dos filas de gránulos basales y perpendiculares a éstas.

No todas las fibras subpeliculares secundarias son de idéntica finura; predominan con mucho las más sutiles, pero en algunas prepara-

ciones teñidas por el carbonato de plata se divisan ciertas fibras de notable grosor que unen entre sí las subpelículaes principales (fig. 11) y no las abordan en ángulo recto, sino que llegan a ellas describiendo una curva y se incorporan al trayecto de las mismas, soldándose con ellas; de ello resulta que las fibras subpelículaes principales aparecen engrosadas en el trecho que recorren conjuntamente con las secundarias (A, A).

El ectoplasma está cruzado por fibras perpendiculares a la superficie del cuerpo, que llamaré fibras elementales, y corresponden aproximadamente a las que SCHNEIDER designó con este mismo nombre (figs. 13 y 15, E). A la existencia de las que yo denomino fibras elementales aluden explícitamente, además de SCHNEIDER (50), TEN KATE (28), VAN OVERBEEK DE MEYER (60) y VALKANOV (58), tanto en el texto como en los grabados, pero al juzgar por los dibujos, especialmente los de TEN KATE, estos investigadores han visto tan solo un pequeño número de fibras de las muchas que, como demuestran mis

figuras 12 y 13, existen en realidad.

Opinan los mencionados autores que las fibras en cuestión se conectan con los cilios a través de los respectivos gránulos basales, cosa que KONSULOFF (28) no ha podido confirmar. Pero se aprecia bien lo erróneo de esta creencia cuando observamos las preparaciones confeccionadas con el método del carbonato de plata piridinado de RIO-HORTEGA, que las tinte con sin igual precisión. Tales fibras, en efecto, después de seguir un trayecto generalmente rectilíneo en dirección aproximadamente perpendicular a la superficie del cuerpo (fig. 12), van a unirse, no a los gránulos basales de los cilios, sino a las fibras subpeliculares principales, las que, como sabemos, corren paralelamente a las filas de aquéllos y en inmediato contacto con ellas. Algunas de las pocas fibras elementales que han sido dibujadas en la figura 6 (las indicadas con A, por ejemplo) parecen terminar en un gránulo basal por la razón de que el punto de confluencia de la fibra elemental con la subpelicular principal coincide con aquel en que se encuentra un grá-

nulo; mas si nos fijamos en los parajes en los que la subpelicular principal se ha separado de la fila de gránulos basales, veremos algunas de las fibras elementales (B) que abocan directamente a la subpelicular y no llegan en ningún caso a abordar un gránulo basal.

Los autores que dicen haber observado dicha conexión entre fibras elementales y gránulos basales no dan las suficientes pruebas gráficas de su aserto. En efecto, en la figura 3 de TEN KATE (54) aparecen solamente tres fibras elementales que van a unirse a sendos gránulos basales; pero en el mismo dibujo está representada la fibra subpelicular principal (O.L.F.), de modo que, a la vista de aquél, también podríamos decir que la fibra elemental termina en la subpelicular exactamente en el punto en que yace un gránulo basal. Con respecto a las figuras 4 y 5 de este autor, conviene hacer constar que representan secciones transversales del cuerpo y, por consiguiente, lo único que pueden demostrar es la unión de las fibras elementales con la fila de gránulos basales, pero no con gránulos determinados. La misma observación cabe

aplicar a la única ~~figura~~ ~~figura~~ acompaña al trabajo de VALKANOV (58).

La imprecisión de la figura 43 de VAN OVERBEEK DE MEYER (60), que representa una sección longitudinal de Opalina ranarum, no permite tampoco considerarla como un documento de gran fuerza probatoria, puesto que en aquélla se ven unas fibrillas elementales cuyo grosor casi igual al espacio que media entre los gránulos basales contiguos, y claro está que en estas condiciones no se pueda afirmar categóricamente que exista conexión entre fibrillas y gránulos.

En el endoplasma aparecen fibras de mayor o menor grosor y de curso más o menos ondulado, que califico de transversales porque atraviesan aquella zona citoplasmática en todo su espesor en sentido perpendicular al eje del cuerpo de la opalina; estas fibras (figs. 13 y 15, T), cuya dirección coincide aproximadamente con los diámetros transversales del cuerpo, son, por tanto, más o menos perpendiculares a la superficie de éste, pero se entrecruzan y anastomosan unas con otras, de modo que el conjunto de ellas ofrece el aspecto de una red muy espesa e irregu-

lar, cuyas mallas serían rombos con su diagonal mayor perpendicular a la superficie del animal. Las fibras de que hablamos son, en realidad, fascículos o manojos de fibrillas, los cuales pueden disociarse parcialmente, incorporándose fibrillas de una fibra a las de otra, juntándose de nuevo con la fibra primitiva, etc., es decir, que se forma en conjunto un intrincado plexo orientado preferentemente en sentido transversal (figs. 13 y 14). Las fibras transversales, al llegar al ectoplasma, resuélvense en sus fibrillas constituyentes, las cuales no son otra cosa que las fibras elementales a que antes me he referido y que, como sabemos, acaban por unirse con las subpeliculares principales (fig. 13). Excepcionalmente aparecen algunas fibras transversales que pasan casi íntegras de un punto superficial del animal a otro diametralmente opuesto (fig. 15, I) y que tal vez podamos identificar con las que TEN KATE observó en Opallina ranarum y denominó dorsoventrales.

Debajo de la línea de sutura, coincidiendo en dirección con la fibra subsutural, pero separado de ésta por el ectoplasma, yace en el plano

de contacto de esta zona citoplasmática con el endoplasma un ramillete o haz (figs. 13, H y 16) compuesto de numerosas fibras que muestran el mismo aspecto que las transversales, pero siguen un curso muy diferente, pues se encorvan para correr paralelamente a la línea de sutura, ésto es, a la superficie del cuerpo; también estas fibras se resuelven en fibrillas que van a unirse con las subpeliculares principales. En las cercanías del extremo posterior del cuerpo hay algunas fibras transversales típicas, pero predominan numéricamente ciertas fibras que por su grosor y aspecto son idénticas a aquéllas, las cuales nacen en el mismo extremo en que confluyen las subpeliculares principales y corren hacia delante más o menos flexuosas confundiendo al fin con las del retículo transversal (fig. 15, L).

El plexo irregular espeso y preferentemente transversal a que me acabo de referir, engloba en su seno a los núcleos y a las esférulas del endoplasma, aprisionando unos y otros organitos entre sus mallas de modo tal que al producirse una deformación cualquiera del cuerpo de la opalina

por presión, tracción, etc., los citados elementos estructurales no se desplazan en el seno del citoplasma sino que quedan en el mismo sitio que ocupaban; no obstante, si la presión o la tracción alcanzan un grado considerable los mencionados corpúsculos pueden deformarse por efecto de la presión que sobre ellos ejercen las fibras, conforme indicaré al tratar de las ~~esferas~~ endoplasmáticas.

El aspecto del retículo experimenta modificaciones más o menos grandes cuando el animal es objeto de deformaciones. Cuando una opalina, por ejemplo, ha sufrido una tracción por las agujas en sentido longitudinal, como sucede en el ejemplar representado en la figura 17, el retículo, que, como se ha visto, se hallaba orientado preferentemente en sentido transversal, se rectifica en parte en la dirección de la tracción; de aquí resulta que las mallas menos afectadas por la tracción, que eran comparables por su forma a rombos alargados perpendicularmente a la superficie, se deforman hasta asemejarse más a polígonos isodiamétricos, mientras que aquellas en

las que la tracción ha sufrido su máximo efecto se orientan claramente en el sentido de ésta, como acontece en los extremos anterior y posterior de la opalina representada en la misma figura.

Es posible que algunas de las fibras que ha visto TEN KATE, como, por ejemplo, las que en el ectoplasma corren paralelas a las filas de cilios y las que forman ángulos de 60° con estas filas, sean simplemente fibras transversales o fibras elementales que han cambiado de posición en virtud de deformaciones del retículo provocadas por las maniobras de la preparación.

La función del retículo endocelular es, en mi opinión, de índole mecánica. Ahora bien, SCHNEIDER y KONSULOFF interpretaban al retículo como una especie de esqueleto que garantizaba la permanencia de la forma externa del animal a despecho de las deformaciones eventuales del protoplasma. Sin negar la verosimilitud de esta hipótesis, creo, sin embargo, que la misión esencial del retículo consiste en mantener in situ las inclusiones protoplasmáticas (núcleos y esférulas del endoplasma, principalmente),

impedir su deslizamiento ante las presiones externas; en efecto, cuando una acción exterior impulsa a las referidas inclusiones a deslizarse en el seno del protoplasma, la porción reticular que las aprisiona cede hasta cierto punto, pero la permanencia de los núcleos y las esférulas en su lugar está asegurada, porque las porciones fijas del retículo, es decir, las fibras subpeliculares principales a las cuales están unidos indirectamente, impiden su desplazamiento.

Estas fibras subpeliculares principales, como pertenecientes al conjunto del retículo, cooperan a la función mecánica de éste, representando elementos fijos del mismo que, adosados a la película, forman con las subpeliculares secundarias una especie de trama consistente cuyos hilos más gruesos (las subpeliculares principales) sirven de soporte a los restantes elementos del retículo. No creo, pues, que tales fibras sean conductoras de excitaciones destinadas a mover los cilios, como opinan METCALF ⁽³⁶⁾ y KLEIN (25), ni tampoco, en contra de la suposición de KLEIN y de VAN OVERBEEK DE MEYER (60), que a expensas de ellas se formen los gránulos basales.

Esta opinión del último de dichos autores está fundada en la errónea creencia de que los gránulos basales son meros abultamientos de dichas fibras (v. pág. 36), lo cual es completamente inexacto, como se puede comprobar con la simple contemplación de mis figuras 6, 7 y 8.

Las fibras subpeliculares secundarias servirían para impedir el desplazamiento lateral de las subpeliculares principales. Buena prueba de lo que digo es la figura 18, en la que se ven dos fibras subpeliculares principales (B, B) unidas por una secundaria (A) y ligeramente acodadas en su punto de unión con ésta. Trátase de fibras que por efecto de una tensión se hubieran desplazado de no impidiéndolo la subpelicular secundaria, la cual las ha sujetado en su sitio y las ha permitido tan sólo doblarse o acodarse levemente.

Además de las fibras constitutivas del retículo, he hallado en el endoplasma de algunos individuos de Cepedea dimidiata ciertas formaciones fibrilares que merecen especial mención.

A favor del método del carbonato de plata piridinado de RIO-HORTÉGA he obtenido, como hice constar oportunamente, resultados diversos; la variedad de las imágenes que el citado método pone de manifiesto, depende en parte de la cantidad de piridina que se agrega a la solución argéntica, como es el caso para la demostración de las esférulas del ectoplasma, pero en ocasiones es debida a factores difícilmente ponderables (mayor o menor rapidez de calentamiento, temperatura alcanzada en éste, etc.). Pues bien, en algunas preparaciones he logrado una débil impregnación de los ejemplares, en los cuales se han coloreado solamente, pero con gran limpieza, los gránulos basales de los cilios, ambos extremos del retículo endocelular (anterior y posterior), algunas fibras transversales y las notables fibras a que ahora voy a referirme.

Estas últimas, que sin duda resultan enmascaradas por la frondosidad del retículo en las opalinas en que éste se tinte integramente, ofrecen formas sumamente curiosas (figs. 19 y 20): las más tienen figura de S o se muestran más o menos arqueadas, otras forman a modo de madejas o lazos, o

dibujan circunferencias perfectas y otras, en fin, se doblan en forma de 8. En todas estas fibras observé desde luego una estriación longitudinal, lo cual me hizo sospechar que en realidad son haces o manojos de fibrillas muy finas, y luego confirmé esta suposición al comprobar que los extremos de algunas se desagregan o deshilachan en filamentos muy sutiles.

Las fibras más gruesas ofrecen a menudo el aspecto de anillos de apariencia más compacta y rugosa (fig. 19), de lo cual infiero la posibilidad de que se haya verificado un proceso de soldadura de las distintas fibrillas que las integran. Las fibras en cuestión suelen estar sueltas en el seno del endoplasma, pero no es raro que se hallen adheridas a sus congéneres o a las fibras transversales que, en este caso, quedan tangentes a ellas. Un dato importante lo constituye el hecho de que todas estas formaciones se localizan hacia la mitad posterior del cuerpo del protozoo. A veces están situadas en parajes próximos al polo posterior del cuerpo, si bien su ubicación preferente es en el tercer cuarto del animal, faltando

en absoluto - por lo menos en todos los ejemplares que yo he examinado - en la mitad anterior de la opalina. No he encontrado antecedentes de un tipo de fibras de esta clase en la bibliografía protozoológica que he podido consultar; en cambio, presentan una extraordinaria semejanza con otras fibras que algunos autores han observado en células de determinados metazoos.

En efecto, RIO-HORTEGA (46), en el epitelio de la vesícula seminal de Lumbricus y en los folículos setíferos del mismo gusano, y ALVARADO (2) en las células celomáticas del anélido poliqueto Eulalia viridis han encontrado unas epiteliofibrillas atípicas cuyo aspecto es sumamente parecido al que muestran las aludidas fibrillas observadas por mí en Cepedea dimidiata. El primero de dichos autores las compara, por sus características morfológicas, con las que SAINT-HILAIRE (49) descubrió en las células del epitelio intestinal del urodelo Amphiuma - que, por cierto, se asemejan mucho a las de Cepedea, con las observadas por TELLO en la hipófisis y

con las que él mismo ha visto en los epitelomas y en los epitelios de células cúbicas en circunstancias patológicas. ALVARADO, en cambio, fundándose en que las fibras por él descubiertas experimentan una hipertrofia cuando las células a las cuales pertenecen se desprenden del epitelio y degeneran, las halla comparables tan sólo a las descritas por RIO-HORTEGA (46) en células epiteliales del riñón de gatos intoxicados por la tiráidina (1).

(1) Es curiosa la semejanza de las formas de estas fibras con las de las fibras conectivas ensortijadas descritas por ACHÚCARRO y SACRISTÁN (1) en la glándula pineal humana y por E. FERNÁNDEZ GALIANO (13) en el corazón de Helix y también con los filamentos de reticulina que describe BUÑO (7) en un reciente trabajo. Me limito a subrayar esta coincidencia morfológica, pues hay que tener en cuenta que las fibras anulares y retorcidas de Cepedea dimidiata son intracelulares, mientras que las mencionadas por dichos autores están situadas fuera de las células.

En todos los casos anteriormente considerados las fibras retorcidas y anulares parecen ser en cierto modo formaciones degenerativas, pues con respecto a las halladas en Lumbricus por RIO-HORTEGA este autor las designa

explicitamente "formaciones fibrilares de tipo regresivo" y en los demás casos tampoco hay que dudar de este carácter, ya que tales fibras se hallan localizadas en células de epitelomas y en epitelios glandulares afectados por procesos patológicos; en cuanto a las descubiertas por ALVARADO, aunque el estado fisiológico del animal sea perfectamente normal, no hay que olvidar que se producen en células destinadas a servir de alimento a los óvulos, las cuales han degenerado hasta el punto de perder su núcleo. Finalmente, por lo que atañe a las fibras halladas por TELLO en células de la hipófisis, que este autor considera como derivadas del condrioma, RIO-HORTEGA mantiene la opinión de que hay que "rechazar la suposición de que tengan otro origen ni otra naturaleza que la de restos de las epiteliofibrillas primitivas de la invaginación ectodérmica originaria del lóbulo anterior de la hipófisis."

En el caso de las fibras anulares y retorcidas del endoplasma de Cepedea dimidiata no encuentro motivo aparente para considerar-

las como formaciones degenerativas, pues los ejemplares en que las he observado tenían talla y aspecto absolutamente normales. Ahora bien, la mitad posterior del endoplasma es, como luego veremos, la única región del cuerpo de la opalina en que hasta ahora se ha observado una invasión de bacterias, circunstancia que, puesta en línea con los datos suministrados por los autores antes aludidos, me hacen sospechar que también aquí se trata de formaciones de tipo patológico, derivadas del retículo y generadas por la acción de toxinas bacterianas. Esta hipótesis encontraría un serio fundamento si se llegase a demostrar que tales fibras se hallan única y constantemente en individuos atacados por bacterias, cosa que hasta ahora no he podido lograr por la razón de que el método de coloración empleado no tinte simultáneamente bacterias y fibras.

EL ECTOPLASMA

Al observar en vivo opalinas pertenecientes a diversas especies (ranarum, obtrigona, dimidiata, similis y caudata) encontró ZELLER(62) que la zona externa del parénquima del cuerpo -lo que hoy denominamos ectoplasma- presenta un aspecto completamente homogéneo y transparente y no contiene ninguna inclusión. Para TÖNNIGES (55), que ha trabajado sobre material fijado y coloreado, en el ectoplasma de Opalina ranarum existen unas grandes vacuolas, que, al parecer, no encierran inclusión alguna. MAIER (35), en la misma especie, descubre la existencia de dos capas ectoplasmáticas muy bien delimitadas entre sí: una exterior, correspondiente a la que METCALF (36) ha llamado después "subcuticular layer", y otra interior, que corresponde a la "alveolar layer" de este último autor. La capa externa tiene una estructura homogénea, mientras que la interior, que MAIER denomina plasma cortical, la posee finamente

espumosa. En este punto MAIER está de acuerdo con BÜTSCHLI (8) y en contra de la opinión de TÖNNIGES, el cual, como queda dicho, ha visto en esta zona grandes vacuolas.

No obstante, la idea de que en el ectoplasma de las opalinas existen grandes vacuolas va ganando terreno cuando algunos investigadores confirman explícitamente el hallazgo de TÖNNIGES. Por ejemplo, KUNSTLER (31) admite, en Cepedea dimidiata, la existencia, debajo de la cutícula, de una zona ectoplasmática o capa alveolar en la que se muestran grandes celdillas o alvéolos que, al parecer, no son otra cosa que las vacuolas ectoplasmáticas de TÖNNIGES. Por su parte, LÉGER y DUBOSCQ (33) encuentran en Opalina saturnalis una zona ectoplasmática muy desarrollada y provista de anchos alvéolos dispuestos regularmente en una fila única; el número de estos alvéolos y sobre todo su tamaño, aumentan con la edad del animal, hasta el punto de que en los individuos viejos ocupan casi todo el cuerpo, reduciéndose el protoplasma proporcionalmente. Estos mismos investigadores descubren en el interior de los alvéolos una

substancia homogénea, amarilla pálida en el animal vivo, que bajo la acción de los fijadores se habría retraído en forma de esférula, mostrando solamente en su parte central algunos gránulos siderófilos.

BEZZENBERGER (5), en cambio, describe el ectoplasma de Opalina longa como zona protoplasmática completamente desprovista de estructura. Quizá tenga razón METCALF (36) cuando, al comentar este dato, supone que aquel autor ha utilizado un material deficientemente conservado en el cual ha desaparecido todo vestigio de estructura, tanto en la película como en el ectoplasma.

NERESHEIMER (38) ha observado en el ectoplasma de muchas opalinas el mismo aspecto vacuolar descrito por TÖNNIGES, que, a su parecer, solamente se hace ostensible en fases relacionadas con la reproducción.

En preparaciones teñidas con diversos colorantes encuentra METCALF (36) en varias especies de opalinas grandes vacuolas en la capa interna del ectoplasma ("alveolar layer"), especialmente visibles en secciones coloreadas con violeta de metilo, las cuales hallaríanse en Opalina in-

testinalis distribuidas en dos filas irregulares concéntricas: una fila externa, con vacuolas de moderado tamaño, y otra externa, con vacuolas de dimensiones gigantescoas. Entre las vacuolas, y adosadas a las paredes de éstas, hállanse unos gránulos finísimos (citomicrosomias). El hecho de que MAIER no hubiera visto las vacuolas lo atribuye METCALF al exclusivo empleo de la hematoxilina férrea, colorante que, según él, no tinte bien el ectoplasma.

Dentro de cada vacuola halla METCALF un solo corpúsculo ("ectosarc spherule") más o menos voluminoso, de forma irregular y desprovisto de estructura, aun cuando a veces muestra algunos gránulos periféricos. Coincide con LÉGER y DUBOSCQ al afirmar que las esférulas del ectoplasma -que él llama ectosarco- son visibles en el animal vivo y ostentan un color amarillento propio, así como al atribuirles una consistencia líquida; hace notar en apoyo de este último aserto, y también de acuerdo con LÉGER y DUBOSCQ, que el aspecto de ellas en preparaciones fijadas sugiere a veces de un modo irresistible la idea de que son un producto

de la coagulación de un líquido que primitivamente ocupaba toda la vacuola. METCALF las ha coloreado intra vitam con rojo neutro, azul de metileno y azul de toluidina. En cuanto a la significación funcional de tales esférulas no llega a pronunciarse de manera decidida.

Tanto en el animal vivo como en preparaciones fijadas y coloreadas de Opalina ranarum y Cepedea dimidiata KONSULOFF (28) ha visto y estudiado en el ectoplasma vacuolas y esférulas; pero advierte que en ocasiones faltan unas y otras formaciones, coincidiendo entonces el aspecto del ectoplasma con el dibujado por MAIER. En algunos casos las esférulas están unidas por una prolongación a la pared de la vacuola, pero en otras ocasiones no presentan ningún contacto con dicha pared. No es raro el caso de que exista más de una esférula dentro de una misma vacuola. Describe además un segundo tipo de esférulas, en que éstas aparecen como masas sólidas llenas de finos gránulos que se tiñen intensamente con la hematoxilina. En sentir de KONSULOFF, el número de vacuolas se relaciona con el estado de nutrición del animal,

pues ha observado que los animales bien alimentados con albúmina a-
quéllas son muy abundantes, mientras que llegan a desaparecer en las
opalinas hambrientas. No ha logrado ver las esférulas en vivo, lo cual
le conduce a admitir, con METCALF, que su aparición en las preparacio-
nes fijadas es debida a un proceso de coagulación del líquido conteni-
do en las vacuolas.

RUMJANTZEW y KEDROWSKY (48), mediante la aplicación del rojo neu-
tro, han visto en el ectoplasma de Opalina ranarum unos corpúsculos
pequeños que se reparten en dos estratos: el más profundo, situado en-
tre aquella zona protoplasmática y el endoplasma, contiene los gránu-
los algo más gruesos, que afectan forma irregular y se tiñen también
desigualmente con el rojo neutro, con unas zonas más oscuras que o-
tras; los gránulos que están situados más superficialmente, inmedia-
tamente debajo de la película, son más pequeños, redondeados o en for-
ma de bastoncito y se colorean con homogeneidad.

VAN OVERBEEK DE MEYER (60) observa bien las vacuolas en prepara-

ciones de Opalina ranarum coloreadas con hematoxilina férrica, por lo cual no está conforme con la suposición de METCALF de que MAIER no las vió precisamente porque había empleado como agente colorante la hematoxilina férrica de HEIDENHAIN; buscando el modo de conciliar sus observaciones con las de METCALF cree que quizá de una manera casual MAIER y METCALF respectivamente vieron fases de la vida de opalinas sin vacuolas y con vacuolas; el tamaño y el número de las vacuolas aumentaría con la edad de los animales. VAN OVERBEEK DE MEYER ha comprobado también la existencia de esférulas en el ectoplasma, pero no cree que sean cosa diferente de otras esférulas presentes en el endoplasma (v. pág. 81), hasta el punto de incluir aquéllas y éstas en la misma denominación de "Plasmainschlüsse"; con el rojo neutro ha observado formas de transición entre unos y otros corpúsculos, de lo cual infiere que son dos aspectos distintos de un mismo elemento estructural; no concede importancia al hecho de que las sustancias colorantes, a excepción de la hematoxilina férrica, se comporten de diferen-

te modo en unas y otras esférulas.

A juicio del citado autor, tales inclusiones plasmáticas intervienen en el desarrollo de un proceso secretor cuya expresión morfológica sería la aparición de diminutos gránulos (gránulos de secreción) en las esférulas situadas en el ectoplasma, destinados a favorecer la absorción de alimentos y la digestión extracelular. Influido por esta creencia interpreta también como gránulos de secreción ciertos corpúsculos menudos que ha visto en el ectoplasma y que, al parecer, han salido de las inclusiones plasmáticas, los cuales, una vez desaparecidos, dejarían tras de sí un campo vacuolar.

Añadiré, para completar estos datos históricos, que también PATTEN (39) ha observado la presencia de alvéolos ectoplasmáticos en Opalina ranarum.

Mis observaciones acerca del ectoplasma han recaído sobre ejemplares de Cepaea dimidiata coloreados a favor de diversos métodos.

En unos casos he ensayado la coloración vital del animal y en otros he examinado las opalinas en preparaciones confeccionadas principalmente con arreglo a los métodos B y Q de E. FERNÁNDEZ GALIANO (15, 16) y al del carbonato de plata piridinado de RIO-HORTEGA, aplicados a opalinas extendidas sobre cubreobjetos y con muy buenos resultados, como se verá.

Interesa en primer lugar aclarar la nomenclatura un tanto complicada que a las regiones del cuerpo de las opalinas han aplicado los distintos autores, la mayoría de los cuales reconocen tres regiones en el cuerpo de estos animales, que, enumeradas de fuera a dentro, son: la película, el ectoplasma y el endoplasma. Dos únicas excepciones he encontrado a esta regla general, la primera de las cuales, más aparente que efectiva, es la de METCALF (36), quien designa a las dos zonas últimamente nombradas con los apelativos ectosarco y endosarco respectivamente, pero estas denominaciones coinciden exactamente con las de ectoplasma y endoplasma generalmente usadas.

Discrepa también de la nomenclatura tradicional VAN OVERBEEK DE

MEYER (607), para quien el cuerpo de las opalinas se divide en dos regiones únicas: el ectoplasto, que comprende la película y las formaciones subpeliculares (fibras) de que ya he hablado anteriormente, y el endoplasto, que constituye el resto del cuerpo. Como se ve, el mencionado autor no confiere al ectoplasma la categoría de región anatómica perfectamente delimitada, sobre todo por la razón de que identifica las esférulas existentes en el ectoplasma con las que, como más adelante diré, contienen el endoplasma, englobando unas y otras con el nombre común de "Plasmaeinklüsse". Conforme se verá, esta interpretación de las esférulas se halla en pugna con la de los demás autores y con la mía misma.

El ectoplasma de Cepedea dimidiata constituye una estrecha zona protoplasmática que se extiende desde el endoplasma, por dentro, hasta la película, por fuera, y está caracterizado por un conjunto de particularidades que justifican el que lo consideremos como una región anatómica bien determinada. En la capa externa del ectoplasma, que coin-

eide con la que METCALF llama capa subpelicular, hállase un conjunto de fibras que, por considerarlas como parte integrante del retículo endocelular (v. pág. 40), han sido descritas con detalle en el capítulo correspondiente.

Debajo de dicha capa reside la zona que METCALF distingue con el calificativo de alveolar por estar provista de vacuolas o cavidades que albergan sendos corpúsculos ("ectosarc spherules" de METCALF), que yo prefiero llamar esférulas del ectoplasma. La existencia de tales vacuolas ha sido desconocida por algunos investigadores, como ya queda dicho, y también yo comencé por ponerla en duda porque in vivo son completamente invisibles y tampoco las revelan ciertos métodos de coloración. Pero si teñimos las opalinas mediante el método Q, que colorea las esférulas del endoplasma, veremos esta zona totalmente ocupada por dichos corpúsculos, mientras que el ectoplasma aparece débilmente coloreado y sin haberse teñido las esférulas en él residentes; sin embargo, en el ectoplasma son perfectamente visibles numerosos espacios claros

que tienen todo el aspecto de huecos o cavidades (figs. 21 y 22, V).

Estas oquedades parecen estar vacías, si bien en el interior de algunas se divisan unas vagas sombras que pudieran ser las esférulas ectoplasmáticas deficientemente coloreadas (fig. 21). No obstante, no puedo afirmarlo con seguridad, puesto que, repito, el método en cuestión no es apto para la tinción de tales corpúsculos; por otra parte, en las opalinas tratadas por el método del carbonato argéntico de RIO-HORTEGA, que colorea las esférulas del ectoplasma con sin igual perfección, no hallamos formaciones que puedan ser identificadas con vacuolas. Claro está, por consiguiente, que nada puedo añadir a lo dicho por autores anteriores tocante a las relaciones de las esférulas ectoplasmáticas con las vacuolas, ni decidir si aquéllas residen en las vacuolas en número singular o plural, si se hallan o no en contacto con la pared vacuolar, etc.

Las vacuolas residen exclusivamente en el ectoplasma, jamás en el endoplasma; su tamaño es variable, pero, en general, son voluminosas,

llegando algunas a ocupar todo el espesor del ectoplasma. Su forma normal es aproximadamente circular; sin embargo, puede variar cuando el cuerpo del protozoo experimenta alguna deformación, conforme puede verse en la figura 22, representativa de una opalina cuyo cuerpo ha sido estirado por la tracción de las agujas durante las maniebras de la preparación; obsérvese que las vacuolas residentes en la zona de la tracción han quedado estiradas en el sentido de ésta.

Como acabo de decir, no me ha sido posible determinar las relaciones morfológicas existentes entre esférulas y vacuolas del ectoplasma, pero las preparaciones efectuadas a base del carbonato de plata piridinado me han dado ocasión de estudiar las esférulas ectoplasmatícas con toda comodidad, ya que las imágenes obtenidas se muestran con gran pureza de tinción. Las mencionadas esférulas (figs. 23, 24, 25, 26 y 27, Bo) aparecen a primera vista llenando por completo el cuerpo de la opalina (fig. 23), pero una observación cuidadosa, enfocando la zona central del citoplasma, nos revela inmediatamente que

el endoplasma no está invadido por ellas mientras que en la zona ectoplasmática abundan enormemente (figs. 24, 25 y 26).

En la mayoría de los individuos reina bastante uniformidad por lo que atañe a la forma y al tamaño de las esférulas del ectoplasma; son, en efecto, corpúsculos esféricos o elipsoidales cuyo diámetro equivale aproximadamente a la mitad del de los núcleos. Su volumen, sin embargo, va disminuyendo hacia la parte anterior, donde queda reducido proximalmente a la mitad; también en la porción posterior son de tamaño más pequeño.

No obstante, no escasean los ejemplares en los que las citadas esférulas presentan considerables diferencias de volumen y forma dentro de una misma región del cuerpo. En la figura 26, por ejemplo, vemos esférulas cuyo diámetro es casi tan grande como el de los núcleos más pequeños, en tanto que otras son extraordinariamente diminutas; la misma figura demuestra también que aunque entre las esférulas predominan las de forma elipsoidal o esférica, no faltan las baciliformes, piriformes, etc. Además, en algunos casos se ven esférulas dotadas de forma muy irregular, más o menos

lobuladas y de tamaño verdaderamente gigantesco, como puede comprobarse examinando la figura 27, junto a la cual he dibujado el contorno de un núcleo (N) a fin de establecer un punto de referencia en lo que atañe a las dimensiones.

A despecho de las diferencias de tamaño y forma, en las preparaciones teñidas por el método antes indicado todas las esférulas ectoplasmáticas presentan el mismo aspecto de corpúsculos coloreados en café oscuro, en cuyo seno se destacan unos gránulos de matiz algo más intenso. A juzgar por este aspecto, me parece muy razonable la opinión de LÉGER y DUBOSQ (33), corroborada por METKALF y KONSCHLOFF (28), de que se trata de masas primitivamente líquidas, es decir, de gotas coaguladas por la acción del fijador; el hecho de no ser visibles en el animal vivo, así como también sus variaciones de forma y tamaño, son argumentos en favor de esta idea. Su primitivo estado líquido permitiría explicar tales variaciones suponiendo que varias gotas se han reunido para formar otra más voluminosa, y también que una gota se disgrega con facilidad en otras más pequeñas;

las formas irregulares que a veces ostentan (figs. 26 y 27) serían asimismo debidas a las mismas circunstancias.

Por lo que hasta ahora he indicado y por lo que luego diré al tratar de las esférulas del endoplasma, el aspecto de éstas difiere tan considerablemente del que muestran las del ectoplasma que causa extrañeza el hecho de que **VAN OVERBEEK DE MEYER** no admita diferencia fundamental entre unas y otras, sino que, por el contrario, las interprete como expresiones morfológicas variadas de un mismo proceso funcional. A mi entender, el mencionado autor subestima la circunstancia de que, a excepción de la hematoxilina férrica cuando esta sustancia es extraída a fondo ("very thoroughly extracted" dice **METCALF**), todos los demás colorantes muestran una total diversidad de comportamiento con respecto a unas y otras esférulas. El propio **VAN OVERBEEK DE MEYER** confiesa que él mismo ha observado esta diversidad en los resultados de la coloración con el método de **MALLO- RY**, y por mi parte me permito insistir en el hecho de que el método argéntico de **RIO-HORTEGA** tantas veces citado colorea espléndidamente los nú-

cleos y las esférulas del ectoplasma, pero no las del endoplasma, mientras que los métodos B y C de FERNÁNDEZ GALIANO, por el contrario, tienen a la perfección las esférulas endoplasmáticas y dejan completamente incoloras las ectoplasmáticas. Es cierto que las diferencias de colorabilidad ~~una~~ constituyen un criterio decisivo para establecer una separación ~~radical~~ en el orden fisiológico, ni siquiera en el puramente morfológico, de dos formaciones citológicas distintas, pero no es menos verdad que en muchas ocasiones es éste el único criterio que puede servirnos de guía para lograr nuestro propósito. Y aquí precisamente se da este caso, ya que la pretendida identidad de las dos clases de esférulas no pasa de ser una conjetura que carece de suficiente base experimental.

Mediante el rojo neutro en solución diluida he logrado tefir en el ectoplasma de C. dimidiata, en su límite con el endoplasma, ciertas formaciones granulares que, a mi entender, son las mismas que RUMJANTZEW y KEDROWSKY (48) describieron por primera vez en Opalina ranarum y que nada tienen de común con las susodichas esférulas ectoplasmáticas.

(v. pág. 66). Aun cuando METCALF declara haber teñido las esférulas del ectoplasma intra vitam con rojo neutro, azul de metileno y azul de toluidina, yo sospecho que, en realidad, lo que ha observado en opalinas vivas con ayuda de dichos colorantes son los citados corpúsculos de RUMJANTZEW y KEDROWSKY, los cuales no dejan nunca de teñirse con el rojo neutro; digo esto porque yo no he conseguido jamás ver in vivo las esférulas ectoplasmáticas, como tampoco lo ha logrado KONSULOFF a pesar de haberlo intentado.

De acuerdo con la descripción de aquellos autores, he encontrado que estos elementos tingibles por el rojo neutro son de dos clases: los unos presentan el aspecto de corpúsculos pequesísimos redondos o en forma de bastoncitos, teñidos con homogeneidad, y otros más gruesos, de contorno más o menos irregular y provistos de gránulos diminutos más intensamente coloreados; estos últimos corpúsculos se hallarían, al decir de RUMJANTZEW y KEDROWSKY, en una zona protoplasmática algo más profunda.

Nada tengo que añadir a la descripción dada por los citados investigadores, con la cual estoy absolutamente conforme. Debo manifestar, sin embargo, que, a mi juicio, estas dos especies de formaciones no se hallarían distribuidas en dos estratos distintos, sino que coexistirían mezcladas; no obstante, los corpúsculos gruesos llegan a desaparecer por completo en la porción anterior del cuerpo. Los más pequeños, en cambio, persisten en toda la extensión de una ~~zona~~ zona, situada, como queda dicho, en el ectoplasma, ya en el ~~límite~~ límite con el endoplasma. Tengo por seguro que estos corpúsculos diminutos son los mismos que yo he coloreado con el método G (fig. 28, G) precisamente en el paraje indicado, y probablemente también los que VAN OVERBEEK DE MEYER considerará como gránulos de secreción procedentes de las "Plasmacinschlüsse", opinión que, a mi modo de ver, carece de fundamento.

El ectoplasma, además, está cruzado transversalmente en toda su extensión por una serie de fibras, que, como he consignado oportuna-

~~88~~

mente (pág. 45), pertenecen al retículo endocelular y designe con el calificativo de elementales. Es posible que ciertas formaciones de aspecto filamentoso que, según KONSULOFF, atraviesan todo el extoplasma, desde la película hasta el endoplasma, y que este autor interpreta como corrientes de soluciones nutritivas absorbidas por la película, no sean sino fragmentos o trozos de las que yo llamo fibras elementales.

LAS ESFÉRULAS DEL ENDOPLASMA

FUE ZELLER (62) quien, en 1877, observando opalinas vivas pertenecientes a diversas especies, descubrió en el endoplasma de casi todas ellas -es decir, en lo que él llamaba porción interna del parénquima del cuerpo- unos corpúsculos de forma discoidal, acerca de cuya significación funcional no aventuró ninguna hipótesis. Limitose a decir que se hallan en cantidad extraordinaria, que su diámetro es de 4 μ como promedio, que tienen un brillo mate, que su aplanamiento no es muy acusado y que se distinguen sin auxilio de reactivos, si bien destacan mejor tratando las opalinas con ácido ósmico, ácido acético o alcohol muy diluido.

Aparte de algunas vagas indicaciones que, referentes a los corpúsculos discoidales, hace BARFURTH (3) en 1885, interpretándolos como masas irregulares de glucógeno, no hallamos en la bibliografía una

descripción minuciosa de los mismos hasta 1898, fecha en que TÖNNIGES (85) los estudia en secciones de Opalina ranarum coloreadas con hematoxilina férrica. Este autor afirma que los corpúsculos en cuestión son mucho más abundantes cerca de la periferia del cuerpo que en la región central; ostentan forma discoidal, alargada o irregular, siendo variable su tamaño; hállanse de ordinario orientados regularmente en el seno del endoplasma, siendo las caras del disco paralelas a la superficie del cuerpo del infusorio, de modo que en las secciones de éste paralelas a sus superficies planas casi todos los corpúsculos discoidales se muestran circulares, mientras que en las orientadas de otra manera ofrecen, por el hecho de que se ven más o menos de perfil, una forma que se aproxima a la de varillita o bastoncito. La relativa frecuencia con que se observan formas de ovoides y de pasas de gimnasia sugiere a TÖNNIGES la posibilidad de que los corpúsculos lleguen a dividirse al modo como lo haría un núcleo por amitosis. Asegura TÖNNIGES que los corpúsculos discoidales aparecen homogéneos cuando se co-

lorean intensamente con anilinas, pero exhiben una estructura alveolar cuando son teñidos por la hematoxilina férrica.

No opina lo mismo MAIER (35), quien, por el contrario, declara que tales corpúsculos -en Opalina ranarum- se muestran completamente homogéneos cuando son coloreados por la hematoxilina férrica, no apreciándose ^{en} ellos indicios de estructura alveolar. Les atribuye un diámetro de 2 a 3 μ y, de acuerdo con TÖNNIGS, los halla dispuestos paralelamente a las caras aplanadas del animal.

En un trabajo publicado por BEZZENBERGER (5) manifiesta este autor haber coloreado con hematoxilina férrica en el endoplasma de algunas opalinas corpúsculos discoidales, los cuales muestran en su interior gránulos o masas granulosas de tamaño variable (O. ranarum) u ofrecen aspecto homogéneo o casi homogéneo (O. longa). Tampoco ha podido comprobar en ellos estructura vacuolar.

También NERESHEIMER (38), que ha teñido Opalina ranarum con carmín borácico, safranina y diversas fórmulas de hematoxilina, se declara

-24-

ra escéptico tocante a la supuesta estructura alveolar de los corpúsculos discoidales y a la capacidad de éstos para dividirse.

KUNSTLER y GINESTE (32) -quienes no dan cuenta del método técnico por ellos empleado- afirman la presencia en los corpúsculos discoidales, que denominan esférulas trofoplásmicas, de Cepedea dividita de un gránulo central del que irradian prolongaciones que terminan en las paredes de la esférula, recias y refringentes, aunque irregulares en la mayor parte de su extensión. Las esférulas, de aspecto vesiculoso y de un diámetro medio de $1,6 \mu$, se dividirían por estrangulación, previa la bipartición del gránulo central. Asimismo da por segura FAURÉ-FREMIET (12) la división de los corpúsculos de que tratamos (esferoplastos de este autor), los cuales poseerían un gránulo parietal muy pequeño y muy siderófilo que en algunos casos aparece dividido en dos.

En 1909 publica METCALF (36) su importante memoria sobre el género Opalina, en la que, haciendo referencia a los corpúsculos discoid-

dales -que él denomina "endosarc apherules"-, dice haberlos encontrado en todas las especies estudiadas, con caracteres de tamaño, estructura y colorabilidad absolutamente semejantes en todas ellas. Aludiendo particularmente a Opalina ranarum confirma en general los datos proporcionados por TÖNNIGES acerca de la forma, dimensiones, estructura y orientación de las esférulas del endosarco. Rechaza, sin embargo, la idea de TÖNNIGES, compartida por KUNSTLER Y GINESTE, de que las esférulas lleguen a dividirse; declara que, en efecto, no son raras las formas de pesas de gimnasia, pero jamás ha visto ni una sola esférula en que la varilla de unión de las dos masas terminales sea tan delgada que incite a creer en su ulterior ruptura. También niega, en oposición a lo dicho por TÖNNIGES, que las esférulas sean más numerosas cerca de la periferia del cuerpo de la opalina que en la región central; admite, en cambio, que abundan más en la parte anterior del cuerpo, donde el endosarco mismo es más denso.

La variedad morfológica de los corpúsculos disocidales, que ya

hicieron notar TÖNNIGES y NETOALF, fué corroborada por KONSULOFF (28, 29, 30), el cual, observándolos in vivo, apreció en ellos gran diversidad de formas: discoidales, más o menos alargadas, con una estrangulación en su porción central, y siempre los halló provistos de una ostensible membrana. Según los informes de este mismo autor, dichos corpúsculos son muy visibles, a causa de su considerable refringencia, en los cultivos de Opalina ranarum alimentados con albúmina, mas en los individuos mantenidos durante tres días en un líquido indiferente privado de materiales nutritivos pierden su aspecto habitual y dejan de ser reconocibles en vivo; sin embargo, en preparaciones §§§ de opalinas fijadas en estado de inanición coloréanse de igual manera que en los individuos bien nutridos. Mediante una diferenciación suficiente con hematoxilina férrica muestran dichos corpúsculos en su interior varias manchas oscuras.

Al decir de KONSULOFF, los corpúsculos en cuestión se alargan y adelgazan progresivamente por su parte central, haciéndose ésta cada

vez más tenue hasta convertirse en un delgado filamento que, finalmente, se rompe, con lo cual queda dividido el corpúsculo primitivo en dos corpúsculos hijos que no tardan en adquirir la forma discoidal normal. KONSULOFF, que para estas observaciones ha utilizado ejemplares de Copeoda dividiata y Opalina ranarum coloreados con hematoxilina férrica y también con hematoxilina alcohólica de DOFLEIN, atribuye el hecho de que otros investigadores no hayan logrado comprobar la realidad de este proceso de división a la circunstancia de que aquéllos, sirviéndose del método de la hematoxilina férrica, han prolongado excesivamente la diferenciación y, en consecuencia, han hecho invisible el delicado puente de unión de los dos corpúsculos hijos en las fases de división muy avanzadas.

También GOURVITSCH (17) afirma que los corpúsculos discoidales de Opalina elongata se dividen a menudo por simple estrangulación.

VAN OVERBEEK DE MEYER (60), conforme ha adelantado (v. pág. 67), expresa la opinión de que no existe ninguna diferencia fundamental

entre los corpúsculos discoidales y las esférulas del ectoplasma, designando todas estas formaciones con el nombre colectivo de inclusiones plasmáticas (Plasmaeinschlüsse). En sus dibujos (tomados de preparaciones de Opalina ranarum teñidas por hematoxilina férrica) se observan entre las distintas inclusiones grandes diferencias de tamaño y forma, y en el interior de muchas de ellas aparecen gránulos variados, análogos a los descritos con anterioridad por KUNSTLER y GINESTE, BEZZENBERGER y FAURÉ-FREMIET.

Los núcleos de varias especies de opalinas (Cepaea dimidiata, Opalina obtrigona y O. ranarum) han sido objeto por parte de IVANIĆ de un minucioso estudio (19) seguido de otros complementarios (20, 21, 22) y en todos ellos establece este autor una íntima relación entre aquellos organitos y los corpúsculos discoidales. Comienza IVANIĆ asegurando, en contra de lo afirmado por VAN OVERBEEK DE MEYER, que dichos corpúsculos residen exclusivamente en el endoplasma y manifiesta que las formaciones que este autor halló en el ectoplasma y consi-

deró relacionados con los corpúsculos discoidales son meros artefactos, quizá debidos al método de desecación utilizado. En el centro de los corpúsculos discoidales encuentra un gránulo intensamente coloreable por la hematoxilina férrica, confirmando así -aunque sin mencionarla- la antigua observación de KUNSTLER y GINESTE; de acuerdo con KONSULOFF, los halla delimitados por una recia y ostensible membrana. En cuanto a su estructura, los corpúsculos discoidales serían enteramente comparables a los núcleos vesiculosos, puesto que, al igual que éstos, poseen un gránulo central, una membrana, una esfera de filamentos de linina, cromatina granular dispersa por el armazón de linina y, finalmente, una masa lateral que se tiñe ehérgicamente por la hematoxilina férrica y que el autor identifica con un típico cariosoma de plastina. La gran variedad de tamaño que los corpúsculos discoidales presentan es fácil de explicar, según IVANIĆ, pues significaría no más que la expresión morfológica de las distintas fases del crecimiento de aquéllos.

En los dibujos que acompañan al texto los citados corpúsculos muestran figura circular, a veces ligeramente ovalada. Por lo que se refiere a las formas alargadas (en biscocho, pesas de gimnasia, etc.) ya observadas por otros investigadores, opina LVANIĆ que representan fases de división de los corpúsculos, pero no producidas por un sencillo proceso de estrangulación, sino en virtud de un auténtico mecanismo de mitosis. Todo lo cual le conduce inevitablemente a la conclusión de que los corpúsculos discoidales son, en realidad, núcleos vesiculosos jóvenes, capaces de dividirse antes de alcanzar el que podríamos llamar tamaño definitivo. En consecuencia, las opalinas poseerían una sola clase de núcleos.

Las investigaciones referentes a la forma de los cuerpos descritos por ZELLER con el nombre de corpúsculos discoidales son, según acabamos de ver, bastante numerosas, sin que se haya llegado a establecer un criterio unánime, no ya en cuanto a la interpretación de los he-

chos, sino ni siquiera en lo que atañe a los datos objetivos, circunstancia que es de atribuir principalmente a la diversidad de técnicas empleadas por los distintos investigadores; en efecto, casi todos ellos han realizado sus observaciones en preparaciones previamente fijadas y coloreadas y bien sabido es que las estructuras celulares -y especialmente las más delicadas- ofrecen muy diferentes aspectos en relación con las técnicas de fijación y coloración utilizadas.

A fin de evitar los errores de interpretación a que podría conducir el exclusivo empleo de métodos a base de fijación, he llevado a cabo mis observaciones en ejemplares vivos y en animales fijados y teñidos con auxilio de diversos métodos técnicos. Daré cuenta en primer lugar de lo que, referente a la forma de los corpúsculos discoidales de ZELLER, he visto en opálinas vivas, en condiciones naturales y sin el empleo de colorante alguno.

EN Cepedea dimidiata los mencionados corpúsculos se ven perfectamente en vivo y al distinguirlos es cosa sencilla, excepto cuando

el animal se halla repleto de gotas de grasa, porque entonces estas gotitas, por su gran refringencia, los enmascaran y ocultan. En casi todos los casos, cuando la opalina está en reposo y su cuerpo no presenta deformación alguna, los llamados corpúsculos discoidales muestran una figura perfectamente circular, lo que podría significar que su forma es verdaderamente la de un disco; pero esta interpretación cabe por su base al reparar que todos ofrecen el mismo aspecto circular, cualquiera que sea su situación dentro del endoplasma, pues si efectivamente fuesen discoidales, los situados junto a los bordes del animal se nos mostrarían alargados, es decir, veríamos los discos de perfil, toda vez que la sección del cuerpo del cuerpo de las opalinas de la especie G. dimidiata es aproximadamente circular. De ello infero que los corpúsculos en cuestión tienen forma esférica, y me corroboro más en esta idea cuando veo girar la opalina alrededor de su eje, puesto que durante esta rotación no pierden aquéllos su figura circular en el curso de la trayectoria que describen, que, natural-

mente, es una circunferencia.

Convencido, pues, de que los llamados corpúsculos discoidales tienen forma esférica en el animal vivo —por lo menos en G. dimidiata— estimo conveniente emplear, como haré en lo sucesivo, la denominación de esférulas del endoplasma o del endosarco, propuesta por METCALF en 1909.

Los corpúsculos de que hablamos, que jamás los he hallado en el ectoplasma, están distribuidos con uniformidad por todo el endoplasma, salvo en la región correspondiente al extremo anterior del cuerpo, donde, como ya hizo notar METCALF, están concentrados en mayor cantidad. Hállanse, en general, en gran número, aunque éste varía bastante de unos individuos a otros. Su tamaño, según he podido comprobar, es también variable, incluso dentro de un mismo animal, y oscila entre 2 y 4 μ de diámetro. Por su refringencia, ligeramente superior a la del protoplasma ambiente, que los hace resaltar con limpios contornos, producen en quien los observa en vivo la impresión de go-

tas de una substancia de consistencia más o menos fluida.

En raras ocasiones he visto en ejemplares vivos, aunque mostrando ya los primeros signos de la necrobiosis (en el sentido de VERWORN [61]), corpúsculos de figura oval, con el diámetro mayor del óvalo dispuesto transversalmente en relación con el cuerpo del animal. Se trata, a mi modo de ver, de corpúsculos de forma de elipsoide de revolución achatado y con su eje orientado paralelamente al diámetro mayor del protozoo; el achatamiento del elipsoide lo demuestra la circunstancia de que al girar la opalina precisamente alrededor de su diámetro máximo, tales corpúsculos no cambian su forma ni su tamaño aparentes, lo que sucedería en el caso de que afectasen la forma de un elipsoide de revolución alargado y con su eje perpendicular al diámetro mayor del infusorio, puesto que entonces aparecerían circulares en cierto punto de su trayectoria, o la de un elipsoide de tres ejes, ya que en este caso cambiarían el tamaño y la forma aparentes del corpúsculo durante el movimiento giratorio del animal.

En una sola ocasión he observado un ejemplar vivo de G. dimidiata en división y vi en él que las esférulas alojadas en el territorio endoplasmático por el cual habría de pasar el plano de división celular presentaban una forma muy alargada, como de bastones algo irregulares y orientados todos en sentido transversal, es decir, paralelos entre sí (fig. 28). Algunos de estos corpúsculos ofrecían una vaga semejanza con pesas de gimnasia o biceochos.

Veamos ahora cual es la posible causa de la deformación de las esférulas en el caso a que acabo de aludir. A mi entender, las deformaciones de toda índole que afectan a las esférulas en el animal vivo son debidas a las presiones efectuadas sobre ellas por las fibras del retículo que tan estrechamente las abrazan. En efecto, consideremos la figura 29, representativa, como ya he indicado, de una opalina que se encuentra en trance de división; precisamente en la región por la que va a pasar el plano de división las esférulas presentan una forma alargada, a modo de bastones que se disponen perpendicularmente a es-

te plano virtual de división; en este caso parece evidente que, iniciándose ya la separación de las futuras células hijas, la resultante de la vibración conjunta de los cilios de cada una de ellas tiende a impulsarla en dirección ligeramente divergente con respecto a la otra; como resultado de ello se originaría una tensión en la porción del retículo todavía común a ambas células hijas, cuyas mallas se estirarían en el sentido de dicha tensión y las esférulas quedarían comprimidas y deformadas por las fibras del retículo.

Si, ejerciendo sobre el cubreobjetos una presión gradual mediante una aguja, aplastamos una opalina, la película de ésta acaba por desgarrarse parcialmente y sale por la herida una parte del protoplasma, en la cual, como es natural, van comprendidas numerosas esférulas endoplasmáticas. He llevado a cabo esta sencilla experiencia en C. dimidiata y he observado que todas las esférulas afectaban formas esféricas, tanto las que permanecían en el endoplasma contenido en el cuerpo de las opalinas heridas como las que habían salido al exterior

y se habían puesto en contacto con el líquido ambiente. Ni una sola vez he podido hallar esférulas deformadas fuera del cuerpo del animal, sino que siempre las he contemplado largo tiempo en el seno del líquido exterior sin disolverse en éste ni experimentar variaciones de forma o de tamaño.

En este respecto son favorables a mi razonamiento algunos datos contenidos en un trabajo de IVANIĆ (19), del que luego hablaré más extensamente. En efecto, este investigador, tratando de obtener buenas coloraciones de las esférulas endoplasmáticas de Copepea dimidiata, comienza por disociar el cuerpo de la opalina y a continuación fija y colorea las esférulas y núcleos que han quedado fuera de aquél. Pues bien, la inmensa mayoría de las esférulas del endoplasma preparadas en estas condiciones y dibujadas por IVANIĆ afectan forma circular, con excepciones que son probablemente debidas a deformaciones provocadas por el propio modus operandi.

Estos hechos constituyen a mi parecer una demostración de la

consistencia fluida de las esférulas; en efecto, aquellas que en el animal intacto presentaban una figura más o menos elipsoidal o discoidal, al encontrarse rodeadas por el agua y libres por tanto de la presión del retículo se tornan esféricas en virtud de un simple fenómeno de tensión superficial; por otra parte, las que todavía permanecen en el espesor del protoplasma adoptan asimismo la forma de esferas porque también dejan de sufrir la presión de los filamentos del retículo, ya que éste pierde su estado de tensión o tirantez al salir por la herida una parte del protoplasma.

Para completar estas observaciones sobre la forma de las esférulas endoplasmáticas en la opalina viva he ensayado el empleo de colorantes vitales básicos, no sin antes haberme documentado acerca de lo que en este respecto informan otros investigadores, poco numerosos en verdad a juzgar por la bibliografía que he podido consultar.

Figura entre ellos como más antiguo PROWAZEK (41, 42), quien, tra-

tando Opalina ranarum con rojo neutro, no consiguió, en ejemplares perfectamente vivos, más que una coloración difusa del protoplasma en tono rosado, sobre la que destacaban los núcleos, algo más intensamente teñidos. Claramente se deduce de estos datos que dicho autor no ha acertado a colorear las esférulas del endoplasma. RUMJANTZEW y KEDROWSKY (48), que también han ensayado el rojo neutro en Opalina ranarum, tampoco hacen constar que se colorean estas esférulas, pues solamente lograron teñir ciertos gránulos de la zona ectoplasmática a los cuales hemos aludido con anterioridad (v. págs. 66 y 77).

METCALF (36) afirma haber teñido intra vitam las esférulas del endoplasma, en todas las especies de opalínidos por él estudiadas, con rojo neutro, violeta de metilo, dalia y violeta de genciana; circunstancia que le hace sospechar que los repetidos corpúsculos no pueden ser considerados como componentes vivos de la célula. En cambio, KONSULOFF (28), trabajando con varias especies de opalínidos (Opalina ranarum, Cepedea dimidiata y Protoopalina intestinalis), no ha logrado to-

dir con rojo neutro las esférulas; en cambio, ha podido colorearlas con violeta de genciana.

VAN OVERBEEK DE MEYER (60), por su parte, afirma que solamente con rojo neutro y verde Janus ha visto coloreadas las esférulas endoplasmáticas, si bien con el último de dichos reactivos destacaban débilmente a causa de haberse teñido con poca intensidad.

En mis observaciones he utilizado para la coloración vital de Cepedea dimidiata dalia, violeta de metilo, azul de metileno, rojo neutro, violeta neutro, violeta de cresilo y azul de Nilo, con los resultados que a continuación expongo.

Las soluciones diluidas de dalia, violeta de metilo, azul de metileno y azul de Nilo no colorean ningún componente del cuerpo de la opalina, pero, en cambio, las concentradas producen una coloración difusa del endoplasma bastante intensa que sirve de fondo a las esférulas, las cuales quedan tan débilmente teñidas que, al parecer, son

visibles, más bien que por estar coloreadas, por el contraste que ofrecen con el protoplasma teñido. En cambio, los núcleos se muestran claramente reconocibles por la intensidad con que se tiñen sus macrocromosomas.

El violeta neutro proporciona, incluso con concentraciones débiles, una buena tinción de las esférulas del endoplasma, las cuales destacan en color violado sobre el fondo más débil del protoplasma, mientras que los núcleos se tiñen también intensamente en el mismo tono de color. Prácticamente iguales son los resultados que he obtenido con el violeta de cresile RB.

Como ya he hecho constar en otro lugar (pág. 77), con ayuda de soluciones diluidas de rojo neutro he logrado teñir en C. dimidiata casi constantemente unas formaciones que, sin duda alguna, son las mismas que vieron RUMJANTZEW y KEDROWSKY (v. pág. 66), ya que las ilustraciones del trabajo de estos autores reproducen exactamente las imágenes observadas por mí. No es posible identificar tales formacio-

nes con las esférulas del endoplasma, pues no muestran ninguna semejanza con ellas. Ignoro qué significación fisiológica se puede atribuir a dichos gránulos, si no es que, en virtud de su colorabilidad por el rojo neutro, se les deba asignar la consideración de un aparato de GOLGI disgregado en fragmentos.

Con las soluciones diluidas de rojo neutro se colorea también, aunque difusamente, el protoplasma, destacándose sobre él las esférulas endoplasmáticas con aspecto de gotitas perfectamente esféricas.

El rojo neutro en soluciones concentradas da resultados inconsistentes, pues en algunas ocasiones muere el protozoo antes de haberse coloreado o habiéndose teñido únicamente los gránulos de RUMJANTZEW y KEDROWSKY; en otras, se colorean los núcleos, y singularmente sus macrocromosomas, con gran intensidad, mientras que en pocos casos he visto opalinas en estado agónico con las esférulas del endoplasma fuertemente teñidas.

Casi todos los investigadores que han estudiado las esférulas del endoplasma en opalinas fijadas se han servido, para ponerlas de manifiesto, con preferencia casi exclusiva, del método de la hematoxilina férrea de HEIDENHAIN, con el cual, a juzgar por los dibujos que ilustran las respectivas publicaciones, han obtenido coloraciones bastante aceptables. Algún autor -BEZZENBERGER (5)- ha empleado además paracarmin, y otro -METCALF (36)- ha ensayado, al parecer, con éxito, varias anilinas: fucsina, rubina S, orange G, pardo Bismarck, Kernschwarz, safranina y verde luz, así como también la mezcla triáida de EHRLICH-BIONDI y la de indulina-aurantia-eosina de EHRLICH. METCALF, que, naturalmente, también ha utilizado la hematoxilina férrea, no ha logrado, en cambio, teñir las esférulas endoplasmáticas con hematoxilina DELAFIELD, cosa que yo he conseguido fácilmente en Protoopalina intestinalis (fijada en sublimado acético).

Alentado por los buenos resultados que me dieron los métodos argentícos en el estudio de otros elementos estructurales de las opali-

nas, y que anteriormente quedan consignados, me dediqué a aplicar algunos de ellos al tema de las esférulas endoplasmáticas de Cepedea dimidiata. Con el método del carbonato de plata piridinado de RIO-HORTEGA no obtuve ningún resultado positivo, pues dichas esférulas quedaron completamente incoleras. En cambio, he obtenido coloraciones insuperables, no igualadas por ningún otro proceder de tinción, con el método C de E. FERNÁNDEZ GALIANO (16), y buenas coloraciones, sin llegar a la perfección de aquéllas, con el método A del mismo autor (15) y con la primera variante de RIO-HORTEGA al método tano-argéntico de ACHÚCARRO (45).

El método C, que, repito, da imágenes irreprochables y completas, pues tinte absolutamente todas las esférulas endoplasmáticas, no es igualado en constancia por el método A, pues en algunas preparaciones confeccionadas con este último aparecen, sin que yo sepa por qué razón, algunos individuos de Cepedea con sus esférulas coloreadas espléndidamente, al lado de otros en que aquéllas quedan incoleras y

muestran teñidos únicamente los núcleos. En general, los núcleos y las esférulas endoplasmáticas se comportan en este respecto de modo antagónico, quiero decir que casi nunca se tiñen simultáneamente, sino que aparecen coloreados solamente los unos o las otras.

La plata impregna con toda precisión las esférulas del endoplasma, que resaltan sobre un fondo incoloro o grisáceo (figs. 21, Ena y 22, End); el ectoplasma, en cambio, queda incoloro o muestra un tinte gris en el que suelen destacarse las vacuolas ya mencionadas en otro lugar (pág. 72), pero nunca las esférulas ectoplasmáticas, que permanecen absolutamente invisibles. Se ve, pues, confirmada la observación, hecha por otros investigadores en preparaciones teñidas y por mí mismo en el animal vivo (v. pág. 71), de que las esférulas del endoplasma no invaden jamás la zona ectoplasmática. En mis preparaciones se puede comprobar también la circunstancia, señalada por METCALF (36), de que las repetidas esférulas se acumulan de preferencia en la región del endoplasma próxima al extremo anterior del animal.

Conforme queda indicado, las esférulas del endoplasma de Cope-
da dimidiata son, en el animal vivo, perfectamente esféricas, y es-
ta misma forma conservan aproximadamente en muchas de mis preparacio-
nes, según puede verse en los extremos de los individuos representa-
dos en las figuras 22 y 30. La ligera deformación que en estos casos
sufren las esférulas debe ser atribuida a la acción del líquido fija-
dor.

Pero no siempre son esféricos los mencionados corpúsculos en
las preparaciones fijadas. Antes al contrario, la mayoría de los in-
vestigadores que han estudiado las opalinas en preparaciones fijadas
y coloreadas coinciden en afirmar la variedad de formas que ostentan
las esférulas del endoplasma, las cuales raras veces ofrecen una sec-
ción óptica perfectamente circular, sino que, por regla general, se
muestran alargadas, más o menos oblongas, semejantes a bastoncitos,
bizcochos o pesas de gimnasia ó bien de figura francamente irregular.
En mis preparaciones, las esférulas del endoplasma, tanto en Cope-

dimidiata como en Protocollina intestinalis, presentan aspectos análogos a ~~los~~ los dibujados y descritos por otros autores. Ahora bien, como las esférulas en el animal vivo son esféricas, es forzoso atribuir las diferentes formas que hallamos en las preparaciones fijadas a la intervención de agentes determinantes de deformaciones. Veamos a continuación cuáles pueden ser éstos.

En todas las preparaciones se encuentran opalinas que afectan una forma más o menos globosa y manifiestan una clara deformación de muchas de sus esférulas. Por ejemplo, la figura 21 reproduce el aspecto de un ejemplar de Q. dimidiata, coloreado por el método Q, cuyas esférulas endoplasmáticas (Ena) aparecen aplastadas en sentido antero-posterior. Para explicarnos este hecho debemos tener presente que en las fibras del retículo predomina, como ya sabemos, una orientación perpendicular o casi perpendicular al eje del cuerpo, pero aquéllas no están tensas, rígidas, sino que siguen un curso ligeramente flexuoso. Cuando dichas fibras tienden a rectificarse y, por tanto, a

estrechar las mallas que forman por ~~anastomosis~~ anastomosis con sus vecinas, comprimirán en todos sentidos las esférulas, pero esta compresión será más vigorosa en el sentido anteroposterior porque se aproximan entre sí los planos transversales, constituidos precisamente por las fibras más numerosas y quizá más robustas. La rectificación o estiramiento de las aludidas fibras es consecuencia necesaria del aumento en longitud de los diámetros transversos del animal; pero este aumento, a su vez, depende de la hinchazón producida por la penetración de agua en el protoplasma, fenómeno que, según se sabe, es una de las primeras manifestaciones de la necrosis irreversible que acabará con la vida del protozoo (véase LEPESCHKIN [34]). He aquí, pues, la razón de que las opalinas muertas presenten en general el aspecto más o menos globoso de que antes hice mención.

En la figura 15 se ve claramente que también los núcleos tienden a aplastarse en sentido anteroposterior. Ahora bien, si tenemos en cuenta que tanto los núcleos como las esférulas del endoplasma se a-

plastan en el mismo sentido anteroposterior, parece lógico atribuir el aplastamiento en uno y en otro caso al influjo de un mismo factor, que debe de ser externo a esférulas y núcleos, puesto que unas y otras formaciones son completamente diferentes. Y este agente no puede ser otro que el retículo que envuelve en su malla de fibras a las dos clases de corpúsculos.

Como prueba indirecta de esta acción del retículo podemos estimar el hecho de que el aplastamiento en sentido anteroposterior, tan característico de las esférulas del endoplasma, no se observa nunca en las del ectoplasma, según puede comprobarse con el examen de las figuras 23, 24, 25 y 26. Ello es indudablemente debido a que las presiones que las fibras del retículo puedan ejercer sobre las esférulas ectoplasmáticas son incomparablemente más débiles que las ejercidas sobre los corpúsculos existentes en el endoplasma, ya que, conforme he dicho en otro lugar y expresa gráficamente la figura 13, el sistema fibrilar es en el endoplasma mucho más denso que en el ectoplasma

y está constituido por fibras más robustas.

Otros factores pueden coadyuvar también al mismo resultado, es decir, al aplastamiento de las esférulas endoplasmáticas en sentido anteroposterior o, lo que es igual, al estiramiento de ellas en sentido transversal. Recordemos, en efecto, que en el curso de mis preparaciones, una vez extendido el material en el cubreobjetos y antes de fijarlo con el formol, se deseca rápidamente al aire con objeto de que quede firmemente adherido a la laminilla de cristal. Ahora bien, al verificarse esta adhesión la cara inferior de la opalina resulta comprimida por el cubreobjetos, con lo que el cuerpo del animal aumenta un poco en anchura; este aumento de longitud de los diámetros transversos del infusorio que son paralelos a la superficie del cubreobjetos conducen al estado de tensión de los hilos del retículo que en esta dirección existen y, por consiguiente, al estiramiento de las esférulas en sentido transversal.



Observemos una de las muchas opalinas que en virtud de las maniobras inherentes a la confección de la preparación ha experimentado dobladuras o pliegues en uno o varios parajes de su cuerpo; veremos entonces (fig. 30) que las esférulas endoplasmáticas yacentes en la inmediata proximidad de dichos dobleces (End) ofrecen el aspecto de corpúsculos más o menos alargados, y dispuestos en arcos de circunferencia concéntricos, estando situado el centro de este sistema de curvas en un punto de la línea de dobladura.

Las esférulas que componen las curvas más internas, esto es, las más próximas al pliegue o doblez, son las más deformadas por estiramiento; pero a medida que consideramos curvas más alejadas del centro del sistema la deformación de las esférulas es menos considerable, disminuyendo paulatinamente hasta las curvas más exteriores, en las que los mencionados corpúsculos presentan ya la forma esférica que les es habitual cuando no están sometidos a presiones deformadoras (fig. 30, En). Pero hay todavía algo más que conviene hacer notar, y es que la

profundidad del pliegue va correlativa con la intensidad de las modificaciones morfológicas que experimentan las esférulas del endoplasma; vemos, en efecto, que en un pliegue de escasa profundidad (fig. 31) los arcos de circunferencia que lo circundan son en primer lugar menos numerosos que los que rodean a un pliegue más profundo; en segundo lugar, que las esférulas alineadas en dichos arcos (End) están menos deformadas en los dobleces someros que en los profundos y, finalmente, que en los pliegues de poca profundidad las esférulas ostentan ya su esfericidad normal (En) relativamente a menor distancia del centro del sistema de curvas que en los más profundos.

La deformación de las esférulas situadas en la región endoplasmática afectada por un pliegue o doblez, así como la ordenación de los corpúsculos en curvas concéntricas tienen fácil explicación, pues bien se comprende que al introducirse el doblez como una cuña en el protoplasma de la opalina empuja a los filamentos del retículo y los pone más o menos tensos, obligándolos a disponerse alrededor del pliegue; en su vit-

tud, las esférulas que yacen entre dichas fibras quedan fuertemente oprimidas y se estiran en la dirección de los propios filamentos, adoptando así la forma de bastoncitos ordenados en arcos concéntricos alrededor del dobléz. Como es natural, a medida que las fibras están más alejadas de la superficie del animal, resultan menos afectadas por la presión de la dobladura, por lo que las esférulas contiguas a ellas se deforman menos; estas esférulas, claro está, residen en los arcos concéntricos más externos y, como antes he dicho, son las menos deformadas. Tampoco es difícil de interpretar el hecho de que los pliegues poco profundos determinen la aparición de menor número de arcos concéntricos y de que en éstos se hallen menos deformadas las esférulas, puesto que la "cufia" del dobléz penetra en el protoplasma menos profundamente.

Otros casos muy interesantes también son aquéllos en que las opalinas han quedado distendidas o estiradas por las agujas al extender el material sobre el cubreobjetos, perfectamente reconocibles a veces

(fig. 22) por la extraordinaria longitud que adquieren los ejemplares afectados por el estiramiento. Pues bien, en estos individuos así deformados las esférulas (End) se han alargado de un modo extraordinario, tomando el aspecto de varillas o bastoncitos siempre orientados en el sentido del estiramiento de la opalina, que es el mismo en que han actuado las agujas al hacer la extensión; por lo tanto tales bastoncitos aparecen dispuestos paralelamente entre sí, hasta el punto de que si examinamos estos parajes del cuerpo de la opalina con lentes de poco aumento recibimos la impresión de que el endoplasma está claramente estirado en dicho sentido. La figura 22, que reproduce el aspecto de una opalina estirada longitudinalmente, y la 32, en la que se ve el animal estirado en sentido transversal, constituyen buena prueba de lo que digo.

Fácilmente se explica la deformación de las esférulas del endoplasma cuando las opalinas mismas están distendidas. Bien se comprende que si la distensión es bastante considerable y se ha verificado en el sentido del diámetro mayor del animal (fig. 22) la mayor parte de las fi-

bras del retículo, incluso aquéllas que en estado de reposo del infusorio son predominantemente transversales, se disponen en sentido longitudinal y, en consecuencia, las esférulas situadas entre estos filamentos y comprimidas por ellos se alargan también en el mismo sentido. Por motivos análogos se efectúa en sentido transversal el estiramiento de las esférulas cuando la distensión del cuerpo de la opalina se ha realizado en sentido perpendicular al diámetro mayor de aquél (fig.32).

En todos los casos de deformaciones de las esférulas ectoplasáticas que venimos estudiando notamos una singularidad que arroja nueva luz sobre la estructura del retículo y viene a confirmar indirectamente el hecho, que ya oportunamente hice constar, de que en la porción anterior del cuerpo de la opalina (y quizá también en el extremo posterior) la dirección predominante que siguen los filamentos del retículo no es la transversal. En efecto, la deformación de las esférulas y la consiguiente ordenación de éstas en un sentido determinado no se observa en la porción anterior del cuerpo - aproximadamente en el cuar-

te anterior - ni en el extremo posterior, pues los corpúsculos en cuestión se muestran aquí más o menos isodiamétricos, acentuándose la forma alargada de los mismos a medida que se alejan de los extremos.

Con frecuencia hallamos en las preparaciones de opalinas individuos en los que la deformación y consiguiente orientación de las esférulas del endoplasma no se verifican más que en pequeñas zonas del cuerpo; es evidente que aquí se han producido ligeras tracciones que han tensado solamente los hilos del retículo en reducidas porciones de éste. A veces encontramos campos endoplasmáticos como el representado en la figura 33 - fielmente copiado de la preparación -, en los que residen esférulas que exhiben las más raras y caprichosas formas; claro es que el origen de éstas debe ser atribuido también a la presión de los filamentos del retículo, la cual no se habría efectuado según una orientación determinada, sino de una manera arbitraria por así decirlo.

Es frecuentísimo el caso, en las preparaciones a que acabo de referirme, de que no son las esférulas endoplasmáticas los únicos elementos

deformados, sino que, influidos también por la presión de las fibras del retículo, los núcleos toman figuras ovaladas con sus diámetros mayores paralelos o casi paralelos al eje de las esférulas deformadas más próximas. Como es natural, dados el mayor tamaño y la menor abundancia de los núcleos y tal vez la mayor consistencia de la materia nuclear, los núcleos deformados no llegan a dibujar en conjunto arcos concéntricos cuando se producen pliegues o dobleces en el cuerpo del animal, pero es cierto que la deformación existe y que los núcleos se estiran en el mismo sentido que las esférulas. El único dato referente a este punto concreto que he encontrado en la bibliografía consta en un trabajo de JIROVEC (23), en cuya microfotografía nº 3 exhibe, entre otros, dos ejemplares de Opalina ranarum con sendos pliegues, en torno a los cuales se disponen los núcleos deformados; por cierto que el citado autor no alude en el texto a este detalle morfológico.

Un ejemplo bien claro de deformación de los núcleos es el repre-

sentado en la figura 9, en la que reproduzco un fragmento del cuerpo de una Cepedea dimidiata estirado en virtud de la tracción por las agujas. En ella se ve que los núcleos (N) han tomado una figura aproximadamente elíptica, con su diámetro mayor paralelo a la dirección de la tracción.

Como ya indiqué en otro lugar, las esférulas del endoplasma observadas en vivo, sin coloración alguna o tratadas por los colorantes vitales, presentan un aspecto que las asemeja a gotas de una sustancia más o menos fluida y anhista, es decir, que en su interior no se percibe ningún rastro de estructura. A veces conservan esta apariencia hialina en las preparaciones fijadas, como puede verse en un dibujo de LÉGER y DUBOSCQ (33), quienes en su lámina XLV, fig. 7, representan un individuo de Opalina saturnalis que contiene varias "pequeñas vacuolas esféricas, con contorno muy neta" que, a juzgar por su forma, tamaño y posición, son verdaderas esférulas endoplasmáticas. Se-

gún HETCALF (36), esta misma apariencia de vacuolas se obtiene después de la tinción de la opalina con carmín borácico y otros colorantes. Puedo añadir a este respecto que, mediante el método de la hematoxilina ferroacética de E. FERNÁNDEZ GALIANO (14) he obtenido, en general, imágenes poco satisfactorias de dichas esférulas, pero en algunos casos éstas se destacaban a modo de circulitos incoloros sobre el fondo teñido del endoplasma, como si fueran auténticas vacuolas.

Aparte de algunos investigadores que encuentran las esférulas endoplasmáticas constituidas por una materia homogénea (MAIER [35] y NERESHEIMER [38] , v. pág. 83), la mayoría de los autores, como ya queda dicho, las suponen en posesión de una estructura bien manifestada, para unos vacuolar, granular para otros, etc. En los individuos de Cepedea dimidiata tratados por los métodos A y C he visto en las esférulas del endoplasma ciertas particularidades estructurales que se hacen perfectamente ostensibles merced a la limpieza de las imá-

genes obtenidas. Apróchase en las opalinas así tratadas variedad de imágenes que, a mi modo de ver, corresponden a aspectos diferentes de una misma estructura ⁽¹⁾.

(1) Algunos de estos aspectos coinciden en parte con los representados por TÖNNIGES en una figura de su trabajo de 1919, reproducida por BELAR (4) en su figura 13, aunque mi interpretación, como se verá, difiere mucho de la expuesta por el primero de dichos autores en la aludida fecha.

En primer lugar, en las preparaciones coloreadas según las normas del método C de E. FERNÁNDEZ GALIANO, las esférulas, como muestran las figuras 21 y 22, Ena, End), están teñidas de un modo homogéneo, variando la intensidad del color desde el pardo violáceo claro al negro intenso y destacándose netamente sobre el fondo pálido y transparente del protoplasma. No obstante esta homogeneidad, que les presta la apariencia de objetos lisos, aparecen en ellas algunas zonas más claras que a primera vista simulan pequeñas vacuolas fraguadas en su masa; pero el examen atento de dichos corpúsculos nos convence de que las

mencionadas zonas claras no son vacuolas ni, como pudiera sospecharse, porciones no impregnadas por la plata, sino que se trata de partes adelgazadas de la esférula a través de las cuales, como es natural, pasa la luz más fácilmente que a través de las partes gruesas. En efecto, como ya sabemos, las esférulas en las preparaciones fijadas resultan deformadas y comprimidas en todas direcciones por los hilos del retículo y, por consiguiente, no es ~~de~~ extrañar que aparezcan en ellas unas zonas más delgadas que otras, pues las primeras serían precisamente las que han sufrido presiones más enérgicas por parte de las fibras reticulares.

Es de advertir, no obstante, que algunas esférulas que se han teñido con gran intensidad presentan una diminuta oquedad circular que ofrece todo el aspecto de una verdadera vacuola. No rechazo la idea de que, en efecto, lo sea, pero de todos modos me interesa hacer constar mi creencia de que, por lo menos a las extensas áreas incolores que en mis preparaciones suelen exhibir las esférulas, se

les debe dar la interpretación expresada en el párrafo anterior.

En la mayoría de las preparaciones confeccionadas según el método A de FERNÁNDEZ GALIANO vemos esférulas que ostentan una estructura granular, con gránulos finos, pero bien ostensibles, densamente repartidos por toda la masa esferular. Casos hay, sin embargo, en los que, sin duda por haberse coloreado las esférulas imperfectamente, parte de los gránulos quedan invisibles (fig. 34).

En ocasiones, tanto en preparaciones confeccionadas por el método A como por el método C, se nota que la porción periférica de las esférulas está teñida mucho más intensamente que la región interna, preferentemente cuando la forma de los corpúsculos persiste más o menos redondeada (fig. 35), de modo que la parte teñida más enérgicamente envuelve al resto de la masa esferular a manera de una gruesa corteza o cubierta (B). Esta envoltura cortical, sobre cuya existencia, como ya sabemos (v. págs. 86 y 89), llamaron la atención KONSULOFF e IVANIĆ, ha sido observada también por SOKOLSKA (51) en Opali-

na ranarum, si bien esta autora, fundándose en los resultados que ha obtenido mediante la aplicación de métodos osmio-crómicos, la considera como una membrana lipoidífera que abarca casi por completo el contenido interior. A juicio de SOKOLSKA, como luego veremos (pág.137), los corpúsculos de que tratamos son, en realidad, elementos de GOLGI cuya materia constitutiva comunicaría con el citoplasma ambiente por medio de una abertura o solución de continuidad, más o menos extensa, existente en la membrana lipoidífera. Las figuras representativas de los supuestos elementos de GOLGI, que acompañan al trabajo de SOKOLSKA, ofrecen una notable semejanza con las imágenes que reproduzco en la figura 35, B, reveladas por el método C en Cepedea dimidiata.

Según puede verse en mis preparaciones, en las esférulas que han quedado deformadas por obra de las diversas acciones que antes hemos estudiado dicha cubierta se ha distendido, adelgazándose en los parajes periféricos de la esférula en que la distensión ha llegado al máximo y permaneciendo con su primitivo grosor en el resto de la por-

ción cortical. En todo caso resulta que sobre el fondo claro de la parte interna de la esférula, coloreada con poca intensidad, destacan manchas oscuras, más o menos irregulares (fig. 36), que no son otra cosa que las porciones de la corteza que conservan más o menos íntegramente su primitivo grosor, pues las más adelgazadas permanecen casi incoloras. Estas imágenes son, por cierto, muy parecidas a las que reproduce METCALF (36) en las figuras 12 y 13 de su publicación de 1909; asimismo mi interpretación está de acuerdo con la afirmación de KUNSTLER y GINESTE (32) de que las paredes de las esférulas son irregulares en la mayor parte de su extensión. A veces, como se observa en la mayoría de las esférulas que han sufrido un proceso de estiramiento longitudinal, convirtiéndose en varillas o bastoncillos, son los extremos de éstos los que aparecen más intensamente coloreados, puesto que son los puntos en que menos se ha adelgazado la corteza (figs. 34 y 37). Las imágenes así obtenidas se asemejan mucho, como luego veremos, a las pretendidas fases de mitosis de IVANIĆ.

Voy a insistir ahora sobre ciertos interesantes aspectos (formas de bizcocho o de pesas de gimnasia) con que a veces se presentan las esférulas endoplasmáticas en las preparaciones fijadas, asunto que, como luego veremos, está íntimamente ligado con el problema de la interpretación fisiológica de dichos corpúsculos.

TÖNNIGES vió ya estas formas y las considerará como precursoras de una división de tipo amitótico, pero en su primer trabajo (55) no siguió adelante en sus conjeturas, sino que dejó a las futuras investigaciones la responsabilidad de decidir si las esférulas del endoplasma son microorganismos parásitos o bien fragmentos de un núcleo preexistente, pero afirmando desde luego que no son granos de excreción. En una publicación posterior (56), en cambio, se decide a estimar las esférulas como formaciones equivalentes a los macronúcleos de otros infusorios, considerando la zona cortical de las mismas como constituida por cromatina y a la central por acromatina; respecto a su procedencia opina que se originan a la manera de los cromidios, de modo

que no representarían una formación macronuclear típica, sino que serían "macrocromidios". En 1927 rectifica al parecer sus antiguas ideas (57), puesto que emite la opinión de que los núcleos vesiculosos son, en efecto, micronúcleos, pero no exclusivamente, porque sus macrocromosomas serían portadores de cromatina vegetativa y, por tanto, equivalentes a un macronúcleo; además, la existencia de un nucleolo que él cree haber descubierto en los propios núcleos vesiculosos le parece una demostración de que éstos son comparables a los de las células de los metazoos, en el sentido de que a un mismo tiempo tendrían a su cargo la función vegetativa y la generativa.

Asimismo KUNSTLER y GINESTE (32), y también FAURÉ-FREMIET (12), creen haber observado divisiones de las esférulas por estrangulación, si bien estos autores atribuyen a dichos corpúsculos una significación muy diferente, pues para ellos ejercen una misión secretora. METCALF (36) confirma la existencia de las formas de bizocho y pesas de gimnasia, pero declara que no ha podido convencerse de que las esféru-

las lleguen a dividirse, pues en ninguna de las formas que ha observado es el filamento de unión de ambas masas terminales lo suficientemente delgado para presagiar su inminente ruptura.

KONSULOFF (28, 29, 30) ha publicado tres trabajos relativos a varias especies de opalinas en los que pretende demostrar la realidad de la división de las esférulas, sosteniendo la idea de que éstas son equiparables al macronúcleo de otros infusorios; esta interpretación la apoya esencialmente en la pretendida división de las esférulas y la ausencia de éstas en los gametos y en los cigotos. Esta última circunstancia refuerza su punto de vista, puesto que las esférulas, como tales macronúcleos, degenerarían durante las fases sexuales, comportándose a este respecto como los macronúcleos de los demás ciliados. Ahora bien, la supuesta falta de esférulas en cigotos y gametos ha sido desmentida por METCALF (36), VAN OVERBEEK DE MEYER (60), IVANIĆ (19) y VALKANOV (59); el primero y el último de estos autores insertan en sus respectivos trabajos dibujos demostrativos de sus afirmaciones.

Por mi parte, no he logrado ver en el animal vivo formas de pesas de gimnasia ni parecidas, excepto en el caso representado en la figura 29, en donde, al lado de esférulas extraordinariamente estiradas hay alguna que ofrece una forma semejante a un bizcocho; en cambio, en mis preparaciones fijadas y coloreadas aparecen con relativa frecuencia. A este respecto interesa hacer constar que todos los autores citados han observado las formas de bizcocho o de pesas de gimnasia solamente en preparaciones fijadas y teñidas.

En las opalinas que en mis preparaciones aparecen muy estiradas en sentido longitudinal o, por el contrario, aplastadas con aumento de su anchura o, en general, en todas aquellas que soportan en todo su cuerpo o en parte de él una tensión más o menos violenta, las esférulas, como queda dicho, han adoptado la forma de varilla o bastón por efecto de su estiramiento (figs. 22, 29, 30, 31 y 32). Entre ellas abundan las formas de bizcocho o de pesas de gimnasia (figs. 38 y 39), lo que demuestra, a mi entender, que son un mero producto del estira-

miento y no significan en modo alguno el comienzo de un proceso de división.

Dice KONSULOFF en el primero de sus aludidos trabajos (pág. 304) que a veces ha observado en sus preparaciones opalinas que presentaban simultáneamente numerosos "macronúcleos" en fases de división, mientras que en otros individuos escaseaban estas fases o faltaban casi por completo. Este hecho se explica, según el mencionado autor, admitiendo que de cuando en cuando pasan los animales por un estado fisiológico favorable para la división de los "macronúcleos". En mis figuras antes citadas se puede comprobar, en efecto, la presencia de numerosas esférulas que simultáneamente ostentan formas alargadas (de varilla, de bizcocho, etc.) y muchas de ellas, como muestra especialmente la figura 22, afectando formas que, seguramente, para KONSULOFF representarían indudables fases precursoras de la división. Sin embargo, la localización de tales formas alargadas precisamente en los lugares en que el cuerpo de la opalina ha sido deformado, ya por esti-

ramiento debido a la tracción de las agujas (figs. 22 y 32), ya por hallarse el animal en vías de división (fig. 29), ya, en fin, por haberse producido dobladuras o pliegues que penetran más o menos profundamente en el endoplasma (figs. 30 y 31), constituye, en mi sentir, una prueba suficiente de que dichas esférulas no se han deformado y alargado para luego dividirse, sino que lo han hecho forzadas por la presión de los filamentos del retículo, que, a su vez, es consecuencia de la deformación del cuerpo de la opalina. Y aun podría insistir, en apoyo de mi modo de ver, en el hecho de que en las opalinas que muestran dobleces o pliegues las formas de esférulas estiradas (bacilares, en bizcocho, etc.) se localizan casi exclusivamente en los arcos concéntricos que rodean a los pliegues, esto es, en las zonas de tensión reticular.

En cuanto a aquellos individuos en cuyo protoplasma no experimentan los hilos del retículo una tensión en dirección predominante, ya sabemos que las esférulas, comprimidas entre las mencionadas fibras,

ostentan las formas más diversas y caprichosas, entre las cuales no es extraño que figuren las de pesas de gimnasia representadas con mayor o menor fidelidad.

Si la reacción nuclear de FEULGEN y ROSSENBECK diera resultados positivos al aplicarla a las esférulas endoplasmáticas, las ideas de KONSULOFF contarían con un firme punto de apoyo, pero, como REICHENOW (44) ha demostrado, y el propio KONSULOFF (30) ha reconocido, la citada reacción da en este caso un resultado francamente negativo. Tan solo, según JIROVEC (23), en los cortes de Opalina ranarum se colorean aquellos corpúsculos con la reacción de FEULGEN, pero muy débilmente, de modo que no puede afirmarse que contengan cromatina. A mi parecer, la circunstancia de que dichos corpúsculos se colorean más o menos intensamente con varias fórmulas de hematoxilina no es un alegato decididamente probatorio de la condición nuclear de aquellos, pues bien sabido es que tales colorantes pueden teñir formaciones histológicas que nada de común tienen con los núcleos. A este

respecto puedo añadir que en todos mis ensayos de coloración de infusorios con carmín acético he obtenido una tinción bastante energética de los macronúcleos y más débil de los micronúcleos; en las opalinas, sin embargo, las esférulas del endoplasma quedan absolutamente incoloras.

En época relativamente antigua -en 1903- había manifestado HICKSON (18) su opinión de que las opalinas tienen núcleos de dos clases, pero, al contrario que KONSULOFF, consideraba las esférulas del endoplasma como micronúcleos, y los núcleos vesiculosos, ya conocidos en aquella fecha, como macronúcleos. Fácilmente se comprende que mis anteriores argumentos, ensaminados a combatir la tesis de KONSULOFF de que las mencionadas esférulas son verdaderos macronúcleos conservan todo su valor para refutar la opinión expresada por HICKSON.

Lo mismo cabe decir con respecto a las ideas de IVANIĆ, ya que también este autor atribuye naturaleza nuclear a las esférulas endoplasmáticas. Pero la originalidad de la técnica aplicada a la especie

Copepodia dimidiata y de las concepciones de dicho investigador merece que dediquemos algunas palabras a comentar su trabajo.

Conforme he adelantado (v. pág. 90), cree IVANIĆ que las esférulas del endoplasma son formas juveniles de núcleos que se dividen por mitosis y más adelante, en virtud de un proceso de crecimiento, llegarán a identificarse con los conocidos núcleos vesiculosos. Aparte de la objeción ya formulada por VALKANOV (59) de que si ello fuese cierto resultarían fundamentalmente diferentes las opalinas binucleadas y las plárinucleadas, me interesa hacer notar que yo no he visto nunca esférulas cuyo tamaño pudiera aproximarse al de los núcleos vesiculosos.

IVANIĆ está persuadido de que el método de los cortes da resultados muy defectuosos cuando se trata de colorear las esférulas endoplasmáticas, por lo cual ha buscado otro procedimiento mejor, que, en su opinión, consiste en desgarrar con las agujas el cuerpo del animal y, a continuación, fijar y teñir las esférulas y núcleos ya

fuera de aquél. Pues bien, entre los dibujos de IVANIĆ que representan, según él, esférulas en vías de división hay algunos que ofrecen semejanza con fases de mitosis, pero que pueden ser perfectamente interpretados de otra manera. A mi entender, los que IVANIĆ considera como cromosomas son sencillamente los gránulos que, según queda dicho, hállanse esparcidos por toda la masa esferular y que, en virtud del estiramiento de la esférula, forzado por las agujas, se han ordenado en líneas aproximadamente paralelas al eje del corpúsculo estirado. Otras figuras que podrían pasar como expresivas de sendos estados de telofase reproducen, a mi modo de ver, esférulas distendidas artificialmente, con sus dos extremos intensamente teñidos por ser en ellos la corteza más gruesa que en el resto del corpúsculo. El "cariosoma" que dibuja IVANIĆ (19) en las figuras que considera como fases de promitosis lo interpreto, dada su posición marginal, como una porción no adelgazada de la corteza; nótese a este respecto la curiosa semejanza que ofrece una de las esférulas representadas

en mi figura 37 (la de la derecha) con los supuestos núcleos en estado de promitosis que reproduce IVANIĆ en las figuras 17, 18 y 28 de su lámina 2ª. En cuanto a otros aspectos dibujados por este autor solo puedo decir que no he observado en mis preparaciones imágenes con las que se los pudiera equiparar.

Mi opinión contraria a considerar las esférulas endoplasmáticas como formaciones nucleares no se basa únicamente en la comparación de las figuras de KONSULOFF y de IVANIĆ con las imágenes de las esférulas que mis preparaciones muestran, sino también en el cotejo de aquellas figuras con las formas de auténticos núcleos que he observado en Cepedea dimidiata mediante un método que los revela de un modo insuperable. Me refiero a la tinción con carbonato de plata y piridina, ideada por RIO-HORTEGA (47), a favor de la cual se tñen los núcleos irreprochablemente, pudiéndose comprobar con ellos con gran claridad los diversos pormenores morfológicos relativos a los macrocromosomas, descubiertos por TÖNNIGES, que no ofrecen en absoluto

ninguna semejanza con las estructuras descritas por los autores antes citados en las esférulas del endoplasma, ni tampoco con las que yo he observado en estos mismos corpúsculos. Me parece interesante hacer notar a este respecto que el mencionado método, que tan espléndidamente colorea los núcleos, no tinte más que en raras ocasiones las esférulas endoplasmáticas, y cuando lo hace no colorea simultáneamente los núcleos.

Otras muchas teorías han sido enunciadas para explicar la posible función de las enigmáticas esférulas del endoplasma, aunque, a decir verdad, reina todavía gran obscuridad con respecto a este punto. Ya he dicho que TÖNNIGES, antes de disputarlas como macronúcleos, dudaba en atribuirles la condición de microorganismos parásitos o la de fragmentos de un macronúcleo, pero negándoles la significación de granos de excreción. CONTE y VANEY (10), que las estudiaron en Prætepalina intestinalis, las estiman bajo el aspecto fisiológico comparables a los granos de zimógeno de las células glandulares y suponen

que se constituyen en el núcleo a partir de la cromatina, emigrando luego al citoplasma a través de la membrana nuclear. Para KUNSTLER y GINESTE (32), así como para FAURE-FREMIET (12), tienen una misión secretora, mientras que METCALF (36) les confiere el carácter de materiales de reserva, suponiéndolas constituidas por un hidrato de carbono del tipo del paraglucógeno y en cuya formación probablemente intervendrían cromidios. KING y GATENEY (24), lo mismo que SOKOLSKA (51), las consideran como constitutivas del aparato de GOLGI; en opinión de GOURVITSCH (17), serían centros de asimilación; PATTEN (39) les atribuye una misión relacionada con la secreción y con la acumulación de alimentos de reserva. VAN OVERBEEK DE MEYER (60), como ya dije en otro lugar, sostiene el criterio de que no existe diferencia esencial entre las esférulas del endoplasma y las del ectoplasma, sino que ambas formaciones representan fases diferentes de un mismo proceso secretor.

Como quiera que mis observaciones son de carácter puramente mor-

fisiológico y no he llevado a cabo investigaciones experimentales conducentes a poner en claro el papel fisiológico de los corpúsculos en cuestión, carezco de base suficiente para juzgar lo que de acertado o erróneo pueda contener cada una de las referidas hipótesis.

BACTERIAS PARÁSITAS EN OPALINAS

Aunque no muy numerosos, no faltan ejemplos de protozoos, del grupo de los ciliados principalmente, cuyo cuerpo sufre invasiones bacterianas, a consecuencia de las cuales, además de otros fenómenos de carácter patológico, sobreviene a veces una degeneración nuclear que más o menos tarde determina la muerte del animal. Entre los infusorios mejor estudiados en este respecto figuran los del género Paramecium, animales que con frecuencia son objeto de la agitación de un microorganismo bacteroide al que PETSCHENKO(4e) ha dado el nombre de Drepanospira Mülleri.

En la información bibliográfica referente a las opalinas no he encontrado ningún dato que acuse el hallazgo de bacterias parásitas en el protoplasma de estos protozoos, cosa tanto más singular si se tiene en cuenta que en estos ciliados, por su condición de autótonos,

no es posible la confusión entre bacterias parásitas y bacterias alojadas en vacuolas digestivas; estimo, por tanto, que la presencia de tales microorganismos parásitos en el cuerpo de las opalinas debe de ser muy poco frecuente.

A favor del método del carbonato de plata piridinado de RIO-HORTEGA (con dos gotas de piridina por cada centímetro cúbico de solución argéntica) he logrado en varias ocasiones, con magníficos resultados, la tinción de bacterias hospedadas en el endoplasma de Copepea dimidiata. Las bacterias en cuestión son de tipo bacilar, miden como promedio $1,5\mu$ de longitud y se hallan localizadas exclusivamente en la porción del endoplasma correspondiente a la mitad posterior del cuerpo. En algunas opalinas las bacterias son numerosísimas y constituyen por su reunión un gran acúmulo más o menos denso, a veces tan voluminoso como el representado en las figuras 40 y 41, B, y bien delimitado. En otros individuos existen acumulaciones bacterianas en número plural (figs. 42 y 43, B), siendo entonces menos

voluminosas que cuando hay un acúmulo único; por regla general se encuentra un grupo de bacterias más numeroso que se alberga junto al extremo posterior del cuerpo y nunca faltan individuos aislados, dispersos por la porción posterior del endoplasma.

Enfocando cuidadosamente la preparación se advierte que las bacterias no invaden nunca el ectoplasma, ni siquiera individualmente, sino que todas ellas residen en el endoplasma; así lo demuestran las figuras adjuntas, en las que la nitidez y claridad con que aparecen los núcleos bastan para hacer comprender que las bacterias yacen en el mismo plano que aquéllos, es decir, en pleno endoplasma. Por otra parte, los núcleos pueden quedar englobados total o parcialmente en el seno de los acúmulos bacterianos, conforme revela especialmente la figura 40. Sin embargo, el aspecto de los núcleos en las opalinas parasitadas que he observado es completamente normal, lo cual, naturalmente, no excluye la posibilidad de que, a semejanza de lo que acontece en otros ciliados, en el transcurso de alguna fa-

se del desarrollo de las bacterias parásitas sufran aquellos organismos alteraciones morbosas más o menos ostensibles.

Aun cuando, como ya sabemos, la coloración del retículo endocelular de las opalinas se logra con auxilio del mismo método que he utilizado para la tinción de las bacterias, en ningún caso he podido obtener la coloración simultánea de estos parásitos y de las fibras reticulares. No obstante, recordando que las fibras ensortijadas y anulares que anteriormente he descrito se hallan localizadas en el extremo posterior del cuerpo, me atrevo a considerar la coincidencia topegráfica de ellas y las bacterias parásitas como un indicio en favor del carácter degenerativo de dichas formaciones fibrilares, demostrado ya en estructuras análogas, existentes en células de metazoos, por RIO-HORTEGA (46) y ALVARADO (2). Claro está que la presunta degeneración de las fibras de las opalinas sería provocada por la acción de toxinas elaboradas por las bacterias parásitas.

PETSCHENKO, en su trabajo antes citado, afirma que las esporas

de Drepanospira Mülleri residentes en el agua de cultivo del infusorio Paramecium penetran en el citoplasma de este animal junto con las partículas orgánicas ingeridas, y allí, merced a la abundancia de materiales nutritivos, se desarrollan rápidamente. Este modo de penetración es sumamente verosímil, pero claro está que no podemos extenderlo al caso de las opalinas, puesto que estos protozoos, por carecer de boca, no pueden ingerir partículas figuradas. Así, pues, nos encontramos aquí frente a un problema análogo al que plantea la presencia de amebas parásitas en el cuerpo de muchos opalínidos, la cual ha sido señalada por diversos investigadores [CARINI y REICHENOW (9), STABLER y CHEN (52), BRUMPT y LAVIER (6)].

RESUMEN

1. En el endoplasma de los individuos vivos de Cepedea dimidiata, observados sobre fondo oscuro, se ven granulaciones pequeñísimas (microsomias); el ectoplasma, en cambio, aparece ópticamente vacío.

2. Durante el proceso mortal de aquellos individuos el endoplasma se llena de gránulos de coagulación, blancos, mientras que el ectoplasma, aunque pierde su transparencia primitiva, conserva su aspecto homogéneo después de la muerte del animal.

3. Los individuos de la citada especie se acumulan en contacto con el aire atmosférico (aerotaxis positiva).

4. En la película de C. dimidiata observada en vivo se ve que las líneas transversales no se hallan en el mismo plano que las longitudinales; el número de éstas que existen entre cada dos filas de cilios asciende con frecuencia a ocho, diez, doce o más.

5. Tratada la película por el carbonato de plata piridinado de RIO-HORTEGA muéstrase formada por bandas longitudinales que alternativamente son anchas y de color oscuro y estrechas y de tono más claro. A lo largo de las primeras corren las líneas longitudinales visibles en vivo; cada una de las filas de gránulos basales de los oílios constituye la línea central de cada una de las estrechas bandas claras.

6. En cuanto a las líneas transversales de la película, su débil colorabilidad por el carbonato de plata y el hecho de ser perfectamente visibles en vivo hacen dudar de que tengan carácter fibrilar.

7. Descripción de la disposición de los gránulos basales de los oílios en C. dimidiata y de las particularidades de la simetría del cuerpo.

8. Mediante el método del carbonato de plata piridinado se obtienen tinciones del retículo endocelular no superadas ni igualadas por las que dan otros procederes de coloración.

9. El retículo endocelular de C. dimidiata está integrado por va-

rias clases de fibras, a saber: a) un robusto filamento (fibra subsutural) situado en la zona más externa del ectoplasma, debajo de la línea de sutura; b) fibras subpeliculares principales, que arrancan de la subsutural y caminan por debajo de las filas de gránulos basales, siguiendo exactamente la dirección de éstas; c) fibras subpeliculares secundarias, o sea filamentos finísimos que unen entre sí las subpeliculares principales y constituyen en conjunto una red sutil; d) fibras elementales, que están en conexión con las subpeliculares principales y siguen un trayecto generalmente rectilíneo hacia el interior del endoplasma y en sentido aproximadamente perpendicular a la superficie del cuerpo; e) fibras transversales, más o menos gruesas y de curso más o menos ondulado -en realidad son manojos o haces de fibrillas-, que siguen aproximadamente la dirección de los diámetros transversales del cuerpo, pero entrecruzándose y anastomosándose unas con otras para formar en conjunto una red espesa e irregular, y que al llegar al ectoplasma se resuelven en sus fibrillas constituyentes, es decir,

en las fibras elementales.

10. Las fibras subpeliculares principales están en inmediato contacto con las filas de gránulos basales de los cilios, existiendo una relación genética entre aquéllas y éstos. Los gránulos basales no están soldados a las fibras subpeliculares principales, ni siquiera adheridos a ellas.

11. Las fibras elementales no terminan en los gránulos basales de los cilios, sino que abocan directamente a las subpeliculares principales.

12. Debajo de la línea de sutura, en el plano de contacto del ectoplasma con el endoplasma, existe un haz de fibras paralelas a aquélla, las cuales también se resuelven en fibrillas que van a unirse con las subpeliculares principales.

13. En las cercanías del extremo posterior del cuerpo predominan ciertas fibras que nacen en la zona de confluencia de las subpeliculares principales y siguen hacia delante en curso más o menos flexuoso

hasta confundirse con las fibras transversales.

14. El aspecto del retículo endocelular experimenta modificaciones más o menos considerables cuando el cuerpo del animal sufre deformaciones.

15. La principal misión del retículo consiste en mantener in situ las inclusiones protoplasmáticas (núcleos y esférulas del endoplasma), impidiendo su deslizamiento en virtud de las presiones externas.

16. En la mitad posterior del cuerpo de algunos individuos de C. dimidiata hay fibras de curiosas formas, situadas también en el endoplasma: en forma de S, anulares, en figura de 8, etc., que, en realidad, son manojos de fibrillas muy finas y comparables a las que algunos investigadores han observado en células de determinados metazoos.

17. Confirmación, en C. dimidiata, de la existencia de grandes vacuolas en el ectoplasma.

18. En esta misma especie, el carbonato de plata piridinado colorea a la perfección las esférulas del ectoplasma, permitiendo comprobar

bar que residen exclusivamente en esta zona y que no tienen nada de común con las esférulas del endoplasma. Su tamaño es variable, pudiendo llegar a ser casi tan grande como el de los núcleos; va disminuyendo, sin embargo, hacia la parte anterior del cuerpo. Su forma es elipsoidal o esférica, pero a veces muy irregular. Probablemente son gotas líquidas que se han coagulado por la acción del fijador, convirtiéndose entonces en masas sólidas de aspecto granuloso.

19. Mediante la coloración vital con el rojo neutro, y también con el método C de FERNÁNDEZ GALIANO, se ponen de manifiesto en C. dimidiata, en el límite del endoplasma con el ectoplasma, ciertas formaciones granulares análogas a las observadas por otros autores en Opalina ranarum.

20. Las esférulas del endoplasma de C. dimidiata, tal como las revela la observación en vivo, son de forma esférica y, al parecer, de consistencia fluida. A veces, sin embargo, se muestran deformadas a causa de las presiones que sobre ellas ejercen las fibras del retículo

21. Con varios colorantes vitales (rojo neutro, dalia, violeta de metilo, azul de metileno, azul Nilo) las esférulas del endoplasma casi no se tñen; en cambio, se colorean con bastante intensidad mediante el violeta neutro y el violeta de cresilo RB.

22. Las esférulas del endoplasma se colorean de modo insuperable mediante los métodos A y C de FERNÁNDEZ GALIANO.

23. Descripción de las variadas deformaciones que presentan las esférulas endoplasmáticas en C. dimidiata y en Protoopalina intestinalis; son debidas a las presiones que ejercen sobre ellas las fibras del retículo endocelular. La misma causa reconocen las deformaciones que a veces se observa en los núcleos.

24. Las esférulas del endoplasma teñidas por el método C ostentan una estructura homogénea, interrumpida por alguna que otra diminuta vacuola; en cambio, con el método A exhiben estructura granulosa y muestran una zona periférica a modo de corteza que se colorea más intensamente.

25. Algunas formas especiales que en las preparaciones fijadas suelen presentar las esférulas endoplasmáticas (de bizcocho, pesas de gimnasia, etc.), que han suscitado la idea de que estos corpúsculos tienen naturaleza nuclear, se explica fácilmente por la acción de las presiones que en ciertas circunstancias ejercen sobre ellas los filamentos componentes del retículo endocelular.

26. En algunos individuos de C. dimidiata, el método del carbonato de plata piridinado descubre la presencia de bacterias parásitas, localizadas exclusivamente en la mitad posterior del endoplasma; estas bacterias, de tipo bacilar, pueden estar esparcidas, pero de ordinario se hallan congregadas en uno o varios acúmulos más o menos voluminosos.



PUBLICACIONES CITADAS

1. ACHÚCARRO (N.) y SACRISTÁN (J.M.).- Investigaciones histológicas e histopatológicas sobre la glándula pineal humana. (Trab. del Labor. de Invest. biol. de la Univ. de Madrid, t. 10, 1912.)
2. ALVARADO (S.).- La diferenciación epiteliofibrilar de las células celómicas de los poliquetos y la supervivencia de las epiteliofibrillas. (Mem. de la R. Soc. españ. de Hist. nat., t. 15, 1929.)
3. BARFURTH (D.).- Vergleichend-histochemische Untersuchungen über das Glycogen. (Arch. f. mikrosk. Anat., t. 25, 1885.)
4. BELAR (K.).- Der Formwechsel der Protistenkerne. Jena, 1926.
5. BEZZENBERGER (E.).- Über Infusorien aus asiatischen Anuren. (Arch. f. Protistenk., t. 3, 1904.)
6. BRUMPT (E.) y LAVIER (G.).- Sur l'hyperparasitisme d'Opalines par des Amibes. (Ann. Parasit. hum. et comp., t. 14, 1936.)
7. BÉGIN (G.).-

7. BUÑO (W.).- Sobre una curiosa disposición del retículo ovárico y su posible significación. (Arch. de Histol. normal y patol., t.2, 1945.).

8. BÜTSCHLI (O.).- Protozoa (in Bronn's Klassen und Ordnungen des Thier-Reichs). 1887-1889.

9. CARINI (A.) y REICHENOW (E.).- Über Amöbeninfektion in Zelleriellen. (Arch. f. Protistenk., t. 84, 1935.)

10. CONTE (A.) y VANEY (C.).- Sur des émissions nucléaires observées chez les Protozoaires. (C. R. de l'Acad. des Sc. de Paris, t.135 1902.)

11. CHATTON (E.) y BRACHON (S.).- Le cinétome de l'Opalina ranarum, sa continuité génétique et son importance à l'égard de l'évolution des appareils ciliaires. (C.R. de l'Acad. des Sc. de Paris, t.202, 1936.)

12. FAURÉ-FREMIET (E.).- Sur la structure intime du protoplasma chez les Protozoaires. (C.R. de l'Acad. des Sc. de Paris, t.142, 1906.)

13. FERNÁNDEZ GALIANO (E.).- El tejido conjuntivo del corazón de

Helix. (Treb. de la Soc. de Biol. de Barcelona, año 1918.)

14. FERNÁNDEZ GALIANO (E.).- Un método rápido de coloración con hematexilina férrica. (Bolet. de la R. Soc. españ. de Hist. Nat., t. 23, 1928).

15. -----.- El condrioma de la fibra muscular estriada de los anfibios y su participación en la producción de grasa. (Mem. de la Acad. de Cienc. y Artes de Barcelona, t. 23, 1934.)

16. -----.- Los cambios morfológicos preparatorios de la contracción de las miofibrillas en los músculos estriados de los anfibios. (Bolet. de la R. Soc. españ. de Hist. Nat., t. 42, 1944.)

17. GOURVITSCH (V.).- La faune des Protozoaires de l'intestin des Grenouilles des environs de Tashkent. (Bull. Univ. Asie Centr., Lief. 14, 1926.)

18. HICKSON (S. J.).- The Infusoria. (En el Treatise of Zoology de RAY-LANKESTER.) London, 1903.

19. IVANIĆ (M.).- Zur Aufklärung der Kernverhältnisse und der

Kernteilung bei der im Enddarme der gemeinen Erdkröte (Bufo vulgaris (Laur.)) lebenden Opaline, Copeoda dimidiata Stein. (Arch. f. Protistenk., t. 80, 1933.)

20. IVANIĆ (H.).- Ein Beitrag zur Kenntnis der im Enddarme des Laubfrosches (Hyla arborea L.) lebenden Opaline, Opalina obtrigona Stein. (Zool. Anz., t. 108, 1934.)

21. -----.- Ein neuer Beweis für die Kernnatur der sog. "scheibenförmigen Körperchen" bei Opalinen. (Zool. Anz., t. 108, 1934.)

22. -----.- Die Kernteilung bei Opalina ranarum Stein und O. obtrigona Stein. (Arch. f. Protistenk., t. 87, 1936.)

23. JIROVEC (O.).- Protozoenstudien. II. Die Nuclealreaktion bei einigen Protozoen. (Arch. f. Protistenk., t. 59, 1927.)

24. KING (S.D.) y GATENBY (J.B.).- Note on certain bodies in Opalina ranarum, presumed to represent the Golgi elements. (Quart. Journ. Microsc. Sci., t. 70, 1925.)

25. KLEIN (B.).- Ergebnisse mit einer Silbermethode bei Ciliaten.

(Arch. f. Protistenk., t. 56, 1926.)

26. KLEIN (B.).- Die Silberliniensysteme der Ciliaten. Ihr Verhalten während Teilung und Conjugation, neue Silberbilder, Nachträge. (Arch. f. Protistenk., t. 58, 1927.)

27. KÖLSCH (K.).- Untersuchungen über die Zerfliossungserscheinungen der ciliaten Infusorien (nebst Bemerkungen über Protoplasma-structur, Protoplasma-bewegungen und Vitalfärbungen). (Zool. Jahrb. Abth. f. Anat. u. Ontog. der Thiere, t. 16, 1902.)

28. KONSULOFF (S.).- Untersuchungen über Opalina. (Arch. f. Protistenk., t. 44, 1922.)

29. -----.- Haben die Opaliniden zwei Kernarten wie die anderen Infusorien? (Arch. f. Protistenk., t. 71, 1930.)

30. -----.- Über die Färbbarkeit der Kerne der Infusorien aus der Familie der Opaliniden. (Arch. f. Protistenk., t. 73, 1931.)

31. KUNSTLER (J.).- Notice sur les téguments des microorganismes. (Arch. d'Anat. microsc., t. 6, 1903.)

32. KUNSTLER (J.) y GINESTE (CH).- Les sphérules trophoplasmiques des Infusoires Ciliés. (Q.R. de l'Acad. des Sc. de Paris, t.142, 1905.)

33. LÉGER (L.) y DUBOSCQ (O.).- Notes sur les infusoires endoparasites. LII. Opalina saturnalis Léger et Duboscq, parasite de Box boops L. (Arch. de Zool. expér. et génér., 4^{re} série, t. 2, 1904.)

34. LEPESCHKIN (W.W.).- Zell-Nekrobiose und Protoplasma-Tod. Berlin, 1937.

35. MAIER (H.N.).- Über den feineren Bau der Wimperapparate der Infusorien. (Arch. f. Protistenk., t. 2, 1903.)

36. METCALF (M.M.).- Opalina. Its Anatomy and Reproduction, with a Description of Infection Experiments and a Chronological Review of the Literature. (Arch. f. Protistenk., t. 13, 1909.)

37. -----.- The Opalinid Ciliate Infusorians. (Smiths. Instit. U.S. Nat. Mus. Bull. 120, 1923.)

38. NERESHEIMER (E.).- Die Fortpflanzung der Opalinen. (Arch. f.

Protistenk., Suppl.-Bd., 1907.)

39. PATTEN (R.).- Observations on the Cytology of Opalina ranarum and Nyctotherus cordiformis. (Proc. Roy. Irish Acad., t.41, 1932.)

40. PETSCHENKO (B. DE).- Drepanospira Mülleri, n.g., n.sp., parasite des paraméciums; contribution à l'étude de la structure des bactéries. (Arch. f. Protistenk., t. 22, 1911.)

41. PROWAZEK (S.).- Vitalfärbungen mit Neutralroth an Protozoen. (Zeitschr. f. wiss. Zool., t. 63, 1897.)

42. -----.- Kleine Protozoenbeobachtungen. (Zool. Anz., t.22, 1899.)

43. RAMÓN Y CAJAL (S.).- Fórmula de fijación para la demostración fácil del aparato reticular de Golgi y apuntes sobre la disposición de dicho aparato en la retina, en los nervios y algunos estados patológicos. (Trab. del Labor. de Invest. biol. de la Univ. de Madrid, t.10, 1912.)

44. REICHENOW (E.).- Ergebnisse mit der Nuclealfärbung bei Protozoen. (Arch. f. Protistenk., t. 61, 1922.)

45. RIO-HORTEGA (P. DEL).- Varias modificaciones al método de Achúcarro. (Bol. de la Soc. españ. de Biol., 1916.)
46. -----.- Contribución al conocimiento de las epiteliofibrillas. (Trab. del Labor. de Invest. biol. de la Univ. de Madrid, t. 15, 1917.)
47. -----.- Manera sencilla de teñir epiteliofibrillas y ciertos retículos protoplásmicos de difícil demostración. (Bol. de la R. Soc. españ. de Hist. Nat., t. 26, 1926.)
48. RUMJANTZEW (A.) y KEDROWSKY (B.).- Untersuchungen über Vitalfärbung einiger Protisten. (Protoplasma, t. 1, 1927.)
49. SAINT-HILAIRE (C.).- Über den Bau des Darmepithels bei Amphiuma. (Anat. Anz., t. 22, 1902.)
50. SCHNEIDER (K.C.).- Plasmastruktur und -bewegung bei Protozoen und Pflanzenzellen. (Arb. a. d. Zool. Inst. der Univ. Wien, t. 16, 1906.)
51. SOKOLSKA (J.).- Sur les composants lipoidifères du plasma du protozoaire parasite Opalina ranarum. (C.R. de la Soc. de Biol. de Paris, t. 96, 1927.)

52. STABLER (R.M.) y CHEN (TZE-TUAN).- Observations on an Endamoeba parasitizing Opalinid ciliates. (Biol. Bull., t. 70, 1936.)
53. TELLO (J.F.).- Algunas observaciones sobre la histología de la hipófisis humana. (Trab. del Labor. de Invest. biol. de la Univ. de Madrid, t. 10, 1912.)
54. TEN KATE (C.G.B.).- Über das Fibrillensystem der Ciliaten. (Arch. f. Protistenk., t. 57, 1927.)
55. TÖNNIGES (C.).- Die feineren Bauverhältnisse von Opalina ranarum. (Sitz.-Ber. d. Ges. z. Beford. d. ges. Naturw. zu Marburg. Jahrgang 1898.)
56. -----.- Weitere Mitteilungen über die feineren Bauverhältnisse und über die Fortpflanzung von Opalina ranarum. (Sitz.Ber. der Ges. z. Beford. der ges. Naturw. zu Marburg, 1919.)
57. -----.- Die Karyiokinese von Opalina ranarum. (Sitz.-Ber. der Ges. z. Beford. der ges. Naturw. zu Marburg, t. 62, 1927.)
58. VALKANOV (A.).- Protistenstudien. 9. II. Einiges über das Fasersystem

tem der Opalinidenzelle. (Arch. f. Protistenk., t. 83, 1934.)

59. VALKANOV (A.).- Protistenstudien. 9.III. Die Kernverhältnisse der Opaliniden. (Arch. f. Protistenk., t. 83, 1934.)

60. VAN OVERBEEK DE MEYER (G.A.W.).- Beiträge zu Wachstums- und Plasmadifferenzierungs-Erscheinungen an Opalina ranarum. (Arch. f. Protistenk., t. 66, 1929.)

61. VERWORN (M.).- Allgemeine Physiologie. 7^e edio. Jena, 1922.

62. ZELLER (E.).- Untersuchungen über die Fortpflanzung und die Entwicklung der in unseren Batrachiern schmarotzenden Opalinen. (Zeitschrift f. wiss. Zool., t. 29, 1877.)

EXPLICACIÓN DE LAS FIGURAS

(Todas las figuras se refieren a individuos de la especie
Copepodus dimidiata.)

FIG. 1. Fragmento de la película. F, fila de gránulos basales de los ocelos. S, surcos longitudinales. Carbonato de plata piridinado de RIO-HORTEGA.

FIG. 2, (semiesquemática). Ordenación de los gránulos basales de los ocelos, F, F, filas de gránulos basales de longitud normal; F', F', filas de gránulos basales cortas; A, acumulación de gránulos basales bajo la línea de sutura.

FIG. 3 (esquemática). Un individuo cortado en dos mitades según el plano sagital. F, filas de gránulos basales, algunas de las cuales no alcanzan el extremo posterior del cuerpo; A, acumulación de gránulos basales debajo de la línea de sutura.

FIG: 4.(esquemática). Película de una mitad del cuerpo, rectificada idealmente. F, filas de gránulos basales, algunas de las cuales no llegan al extremo posterior del cuerpo; A, acumulación de gránulos basales debajo de la línea de sutura.

FIG: 5. Extremo anterior de un individuo teñido por el carbonato de plata piridinado. SS, fibra subsutural; SP, fibras subpeliculares principales.

FIG. 6. Cuatro filas de gránulos basales de cilios con sus correspondientes fibras subpeliculares principales. A, fibras elementales que aparentemente terminan en gránulos basales; B, fibras elementales que terminan claramente en fibras subpeliculares principales. Carbonato de plata piridinado.

FIG. 7. Una fila de gránulos basales en evidente discordancia con la fibra subpelicular principal correspondiente. Carbonato de plata piridinado.

FIG. 8. Fragmento de la película de un individuo estirado por

las agujas en la dirección que indica la flecha. Carbonato de plata piridinado.

FIG. 9. Mitad anterior del cuerpo de un individuo fuertemente distendido por las agujas. F, filas de gránulos basales, en las cuales se ven las fibras subpeliculares respectivas; N, núcleo. Carbonato de plata piridinado.

FIG. 10. Red de fibras subpeliculares secundarias. A, fibras subpeliculares principales; B, fibra subpelicular principal que, partiendo de la fibra subsutural (situada a la izquierda, pero no visible en la figura), se interrumpe a menos de la mitad del cuerpo. Carbonato de plata piridinado.

FIG. 11. Red de fibras subpeliculares secundarias. A,A, fibras subpeliculares principales que aparecen muy engrosadas en una parte de su trayecto en que se han soldado con fibras subpeliculares secundarias. Carbonato de plata piridinado.

FIG. 12. Tres fibras subpeliculares principales mostrando cómo se

insertan en ellas las fibras elementales. Carbonato de plata piridinado.

FIG. 13. Vista de conjunto del retículo endocelular. H, haz de fibras endoplasmáticas paralelas a la línea de sutura; L, fibras de curso longitudinal en el extremo posterior; S, fibra subpelicular principal; T, fibra transversal; E, fibra elemental; P, fibra subsutural; N, núcleo. Carbonato de plata piridinado.

FIG. 14. Detalle del retículo en el borde de un individuo joven. No se han teñido las fibras subpeliculares. Obsérvese, aparte de la gran densidad del retículo, la disposición preferentemente transversal de sus fibras. Las aparentes espigas o cabos sueltos (a la derecha) van a desembocar en las subpeliculares principales, aquí invisibles. N, núcleo. Carbonato de plata piridinado.

FIG. 15. Mitad posterior del cuerpo de un individuo teñido débilmente por el carbonato de plata piridinado. L, fibras de curso más o menos longitudinal; T, fibras transversales que atraviesan diametralmente todo el endoplasma; E, fibras elementales; G, fila de gránulos

basales; A, fibra anular; N, núcleo.

FIG. 16. Extremo anterior de un individuo, en el que sólo se ha teñido el mechón o haz de fibras situado debajo de la línea de sutura. Carbonato de plata piridinado.

FIG. 17. Aspecto del retículo endocelular en un individuo que ha sido estirado en sentido longitudinal. N, núcleo. Carbonato de plata piridinado.

FIG. 18. Dos fibras subpeliculares principales (B,B) unidas por una secundaria (A). Carbonato de plata piridinado.

FIG. 19. Ejemplos de fibras anulares y retorcidas halladas en el endoplasma de un individuo. Carbonato de plata piridinado.

FIG. 20. Fibras anulares y retorcidas del endoplasma de otro ejemplar, coloreado por el mismo método.

FIG. 21. Individuo tratado por el método C de FERNÁNDEZ GALIANO. V, vacuolas del ectoplasma; Ena, esférulas del endoplasma.

FIG. 22. Individuo tratado por el método C. V, vacuolas del ecto-

plasma; End, esferulas endoplasmáticas deformadas; En, esferulas endoplasmáticas no deformadas.

FIG. 23. Individuo tratado por el carbonato de plata piridinado. Enfoque superficial. Ec, esferulas del ectoplasma; N, núcleos.

FIG. 24. Individuo tratado por el carbonato de plata piridinado. Enfoque ecuatorial. Ec, esferulas del ectoplasma; N, núcleos.

FIG. 25. Fragmento del cuerpo de un individuo coloreado por el carbonato de plata piridinado. Enfoque ecuatorial. Ec, esferulas ectoplasmáticas; N, núcleos.

FIG. 26. Fragmento del cuerpo de un ejemplar tratado por el carbonato de plata piridinado. Enfoque ecuatorial. Obsérvese la variedad de formas y tamaños de las esferulas del ectoplasma (Ec); N, núcleos.

FIG. 27. Extremo posterior de un individuo, enfocado superficialmente. Obsérvese la diversidad de formas y tamaños de las esferulas ectoplasmáticas (Ec). N, contorno de un núcleo del mismo ejemplar. Carbonato de plata piridinado.



FIG. 28. Individuo coloreado por el método C de FERNÁNDEZ GALIANO. G, gránulos diminutos en el límite del ectoplasma con el endoplasma; Ect, ectoplasma; En, esférulas endoplasmáticas.

FIG. 29. A la izquierda, representación esquemática de un individuo en vías de división. A la derecha, esférulas endoplasmáticas deformadas, residentes en la zona delimitada por la circunferencia del esquema. Examen en vivo.

FIG. 30. Fragmento de un individuo, con una dobladura bastante profunda. En, esférulas del endoplasma no deformadas; End, esférulas endoplasmáticas deformadas. Método C.

FIG. 31. Fragmento del cuerpo de un individuo, con un pliegue somero. En, esférulas endoplasmáticas no deformadas; End, esférulas endoplasmáticas deformadas. Método C.

FIG. 32. Mitad posterior del cuerpo de un ejemplar distendido en sentido transversal. Obsérvese que las esférulas endoplasmáticas (Ená) están alargadas en el mismo sentido. Método C.

FIG. 33. Campo endoplasmático con variedad de formas de esférulas. Método C.

FIG. 34. Esférulas endoplasmáticas tratadas por el método A de FERNÁNDEZ GALIANO. Obsérvese su estructura granulosa.

FIG. 35. Esférulas del endoplasma teñidas por el método C. A, enfoque superficial; B, enfoque ecuatorial. En estas últimas se observa una corteza o cubierta cortical.

FIG. 36. Esférulas del endoplasma, con partes de su corteza adelgazadas. Método A.

FIG. 37. Esférulas endoplasmáticas, alargadas y tratadas por el método C.

FIG. 38. Esférula endoplasmática, muy estirada. Método C.

FIG. 39. Varias esférulas del endoplasma, tres de las cuales parecen estar en vías de división. Método C.

FIG. 40. Mitad posterior del cuerpo de un individuo con un gran acúmulo de bacterias parásitas, que engloba parcialmente varios nú-

cleos. B, bacterias; N, núcleo. Método del carbonato de plata piridinado.

FIG. 41. Mitad posterior del cuerpo de un ejemplar, con un acúmulo de bacterias menos denso que el de la figura anterior. ~~\$\$\$~~ B, bacterias; N, núcleo. Carbonato de plata piridinado.

FIG. 42. Mitad posterior de un individuo, con numerosos y pequeños acúmulos de bacterias parásitas. B, bacterias; N, núcleo. Carbonato de plata piridinado.

FIG. 43. Parte de la mitad posterior de un ejemplar, con bacterias parásitas aisladas o reunidas en grupos poco densos. B, bacterias; N, núcleo. Carbonato de plata piridinado.

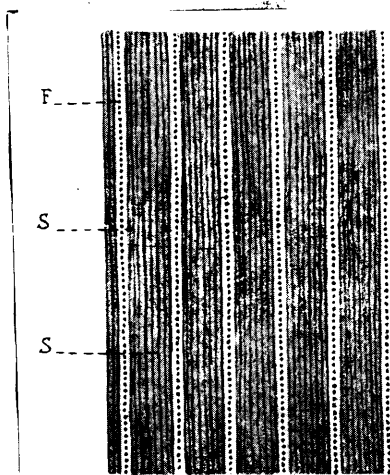


Fig. 1

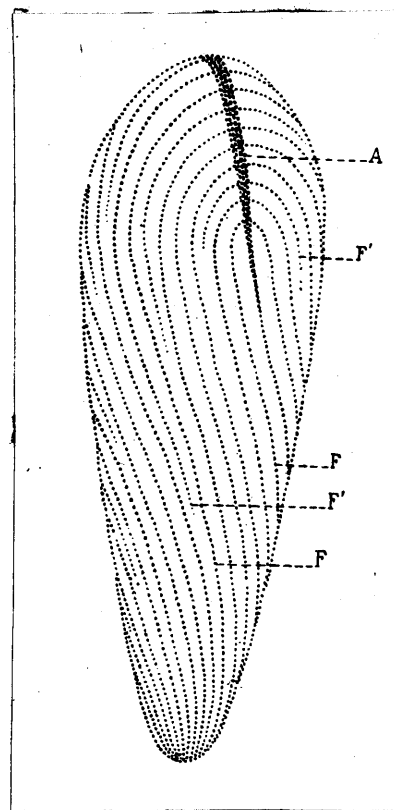


Fig. 2

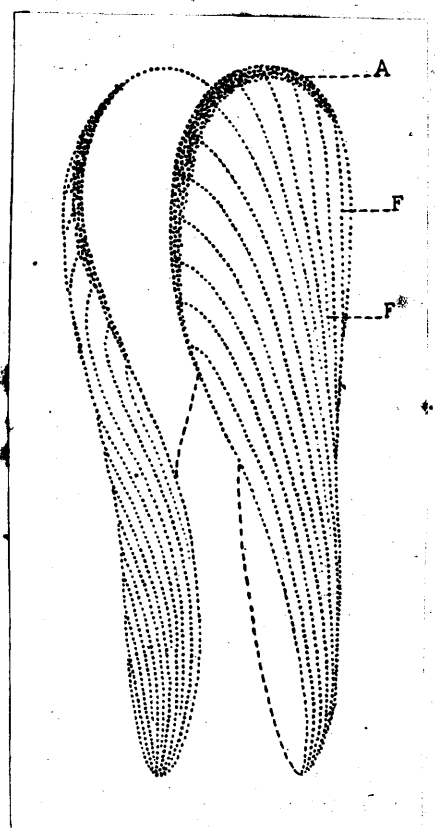


Fig. 3

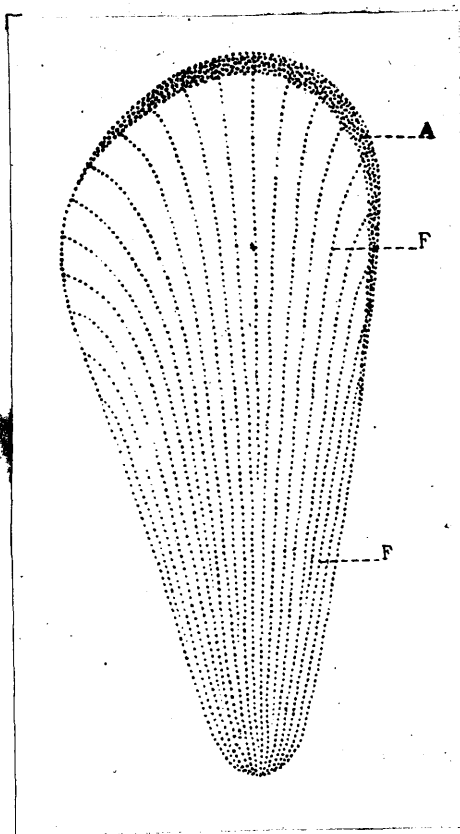


Fig. 4

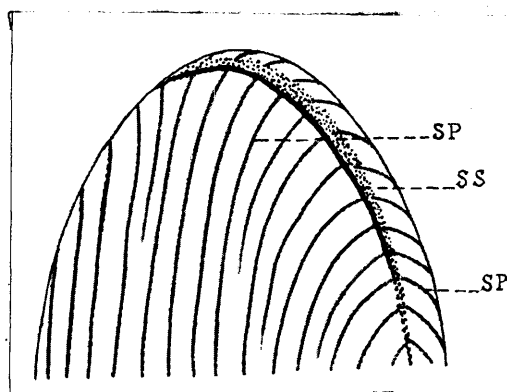


Fig. 5

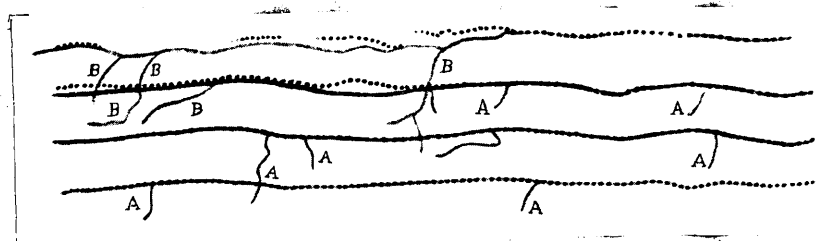


Fig. 6

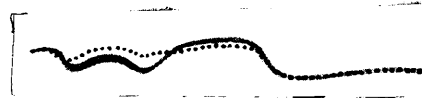


Fig. 7



Fig. 8

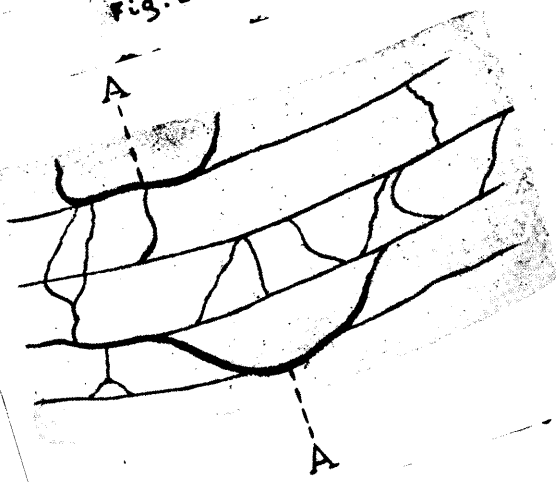


Fig. 11

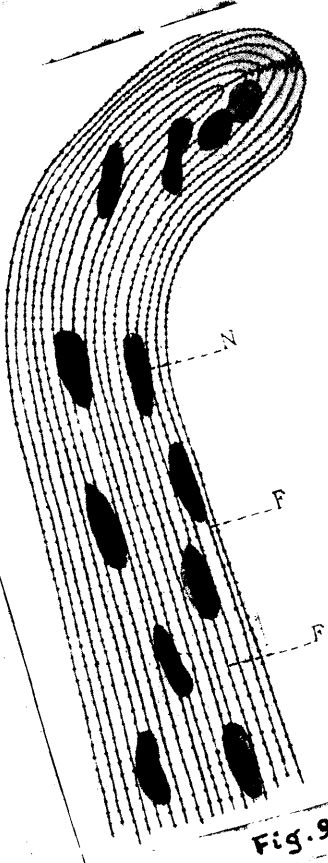


Fig. 9

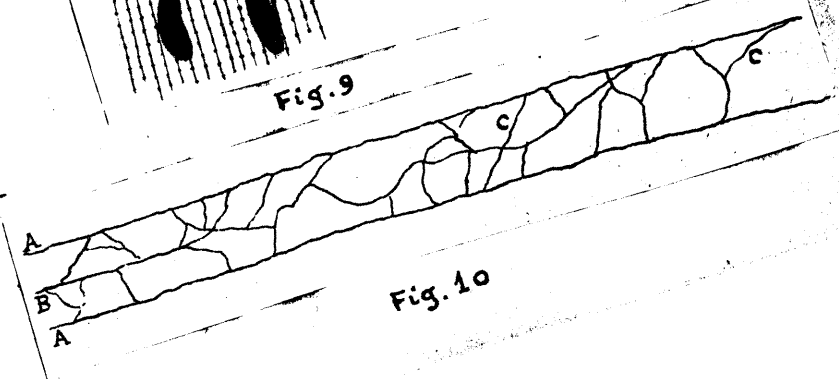


Fig. 10

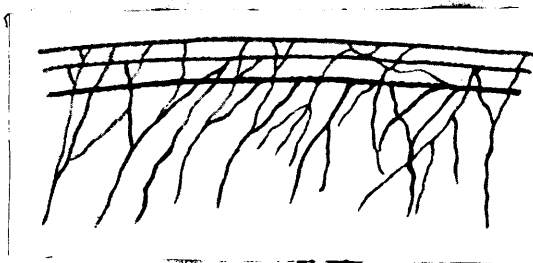


Fig. 12

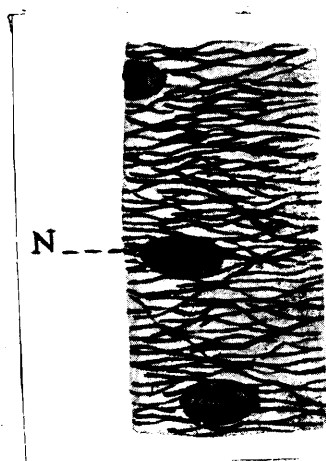


Fig. 14

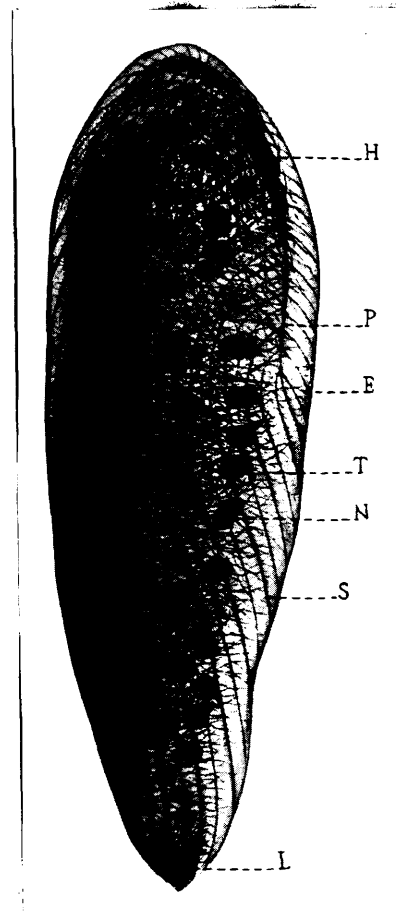


Fig. 13

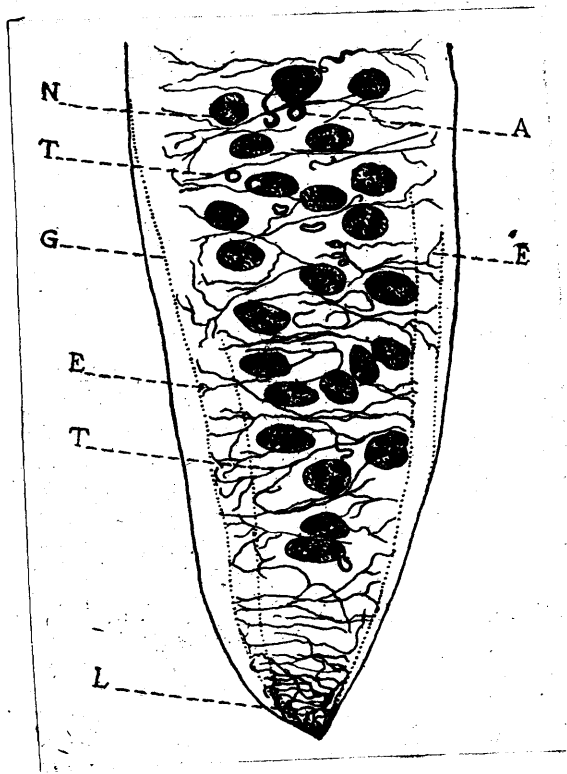


Fig. 15

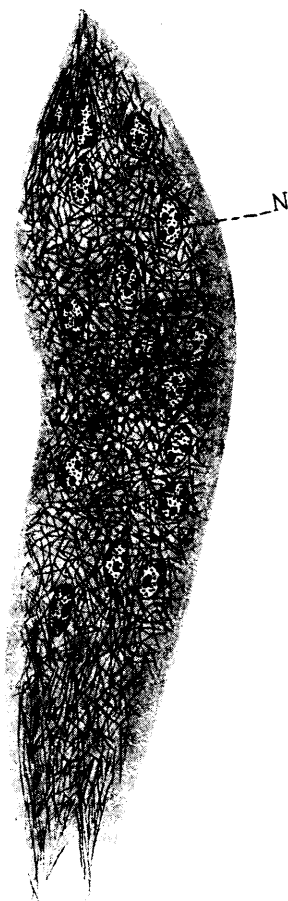


Fig. 17

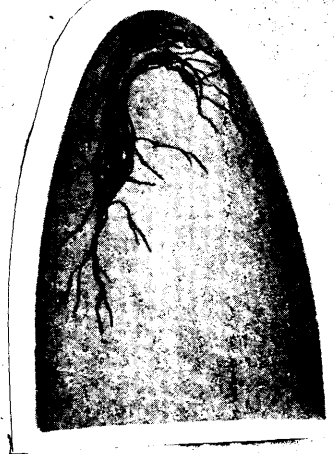


Fig. 16

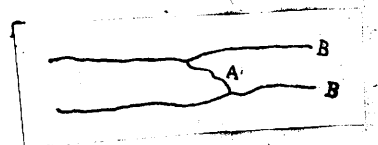


Fig. 18

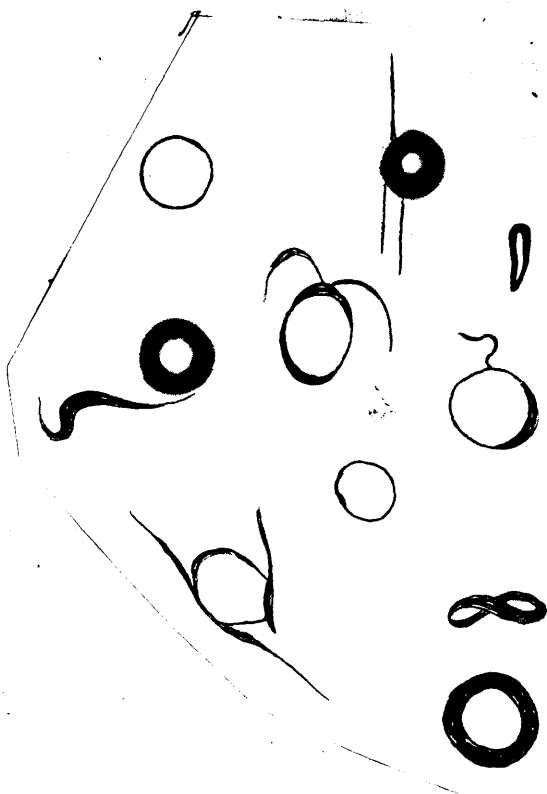


Fig. 19

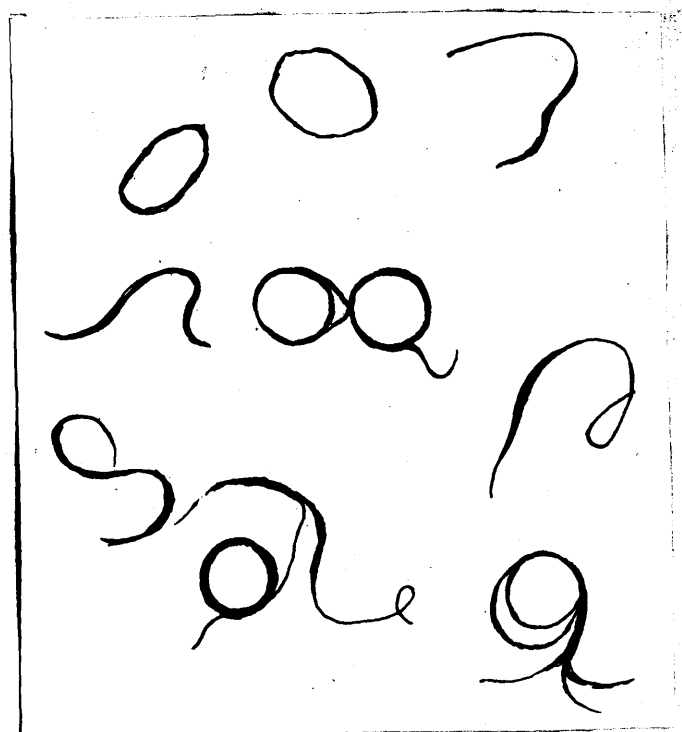


Fig. 20

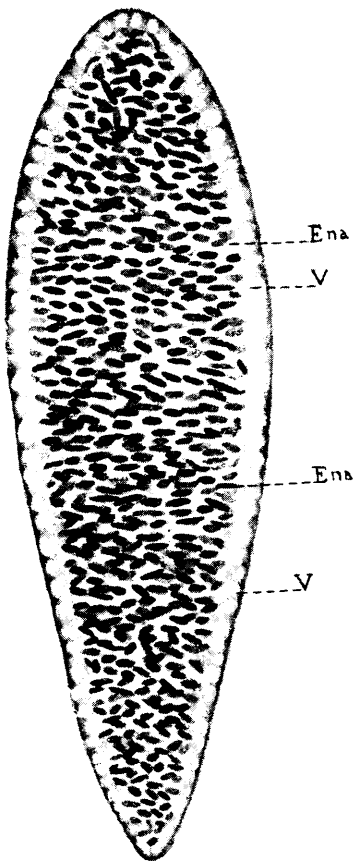


Fig. 21

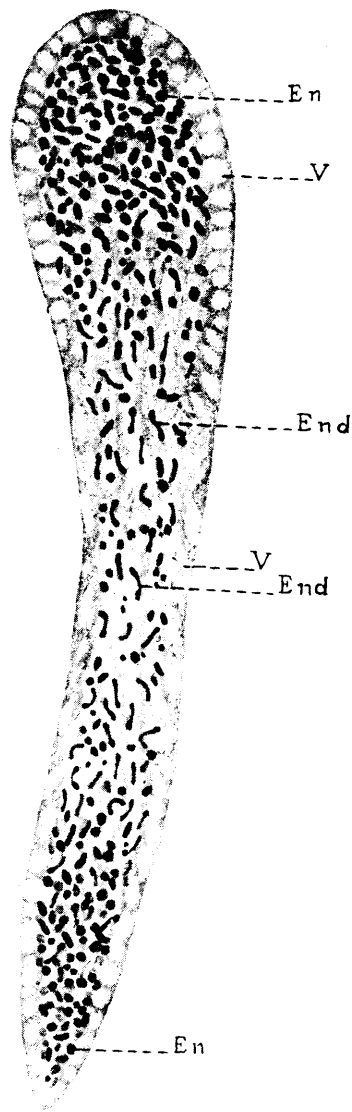


Fig. 22

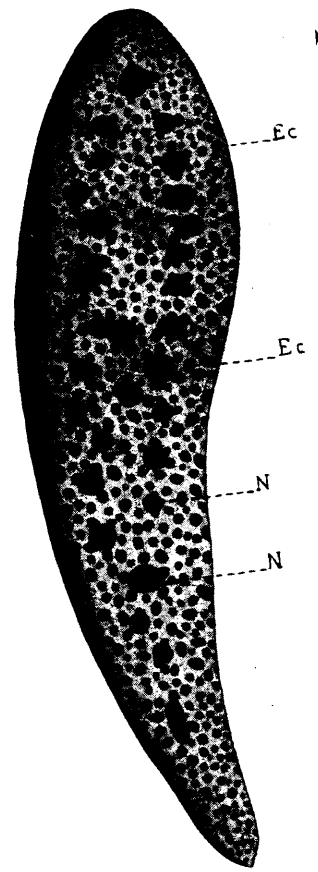


Fig. 23

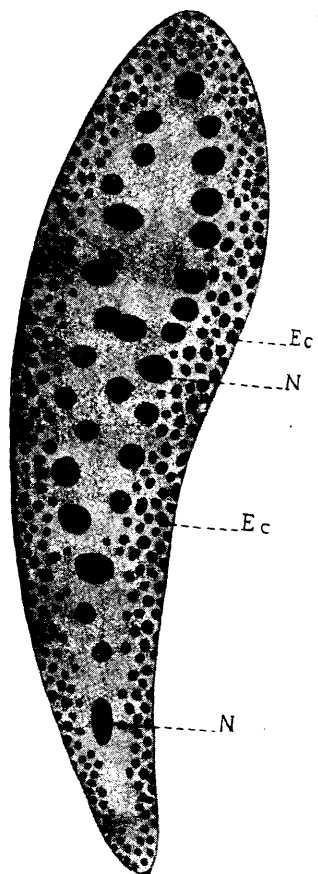


Fig. 24

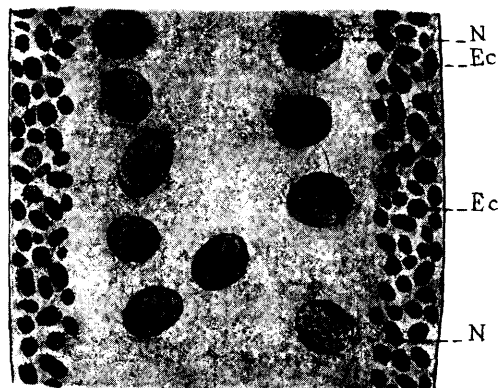


Fig. 25

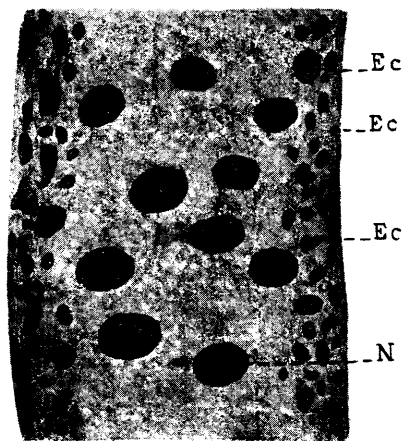


Fig. 26

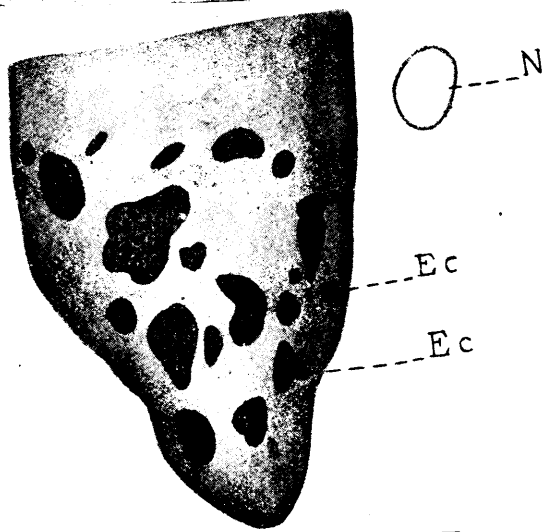


Fig. 27

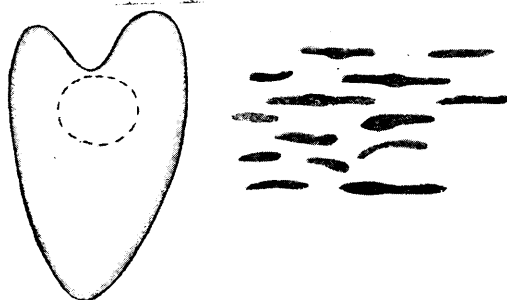


Fig. 29

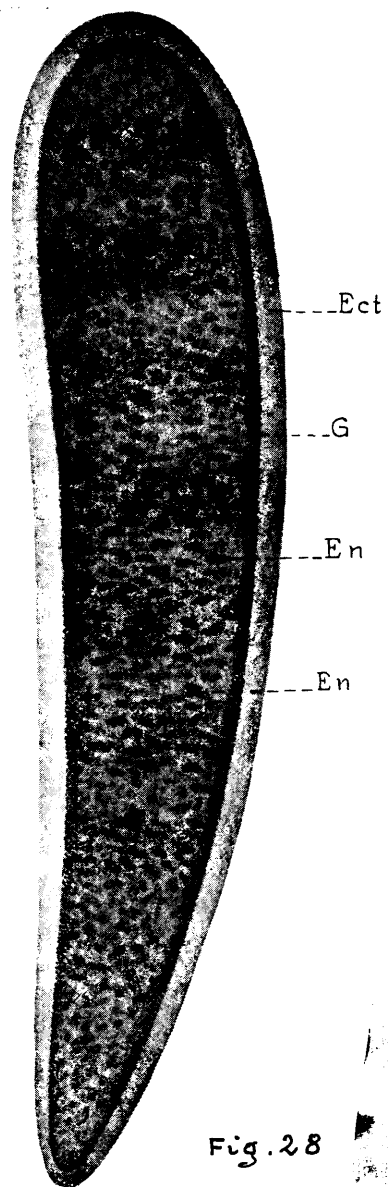


Fig. 28

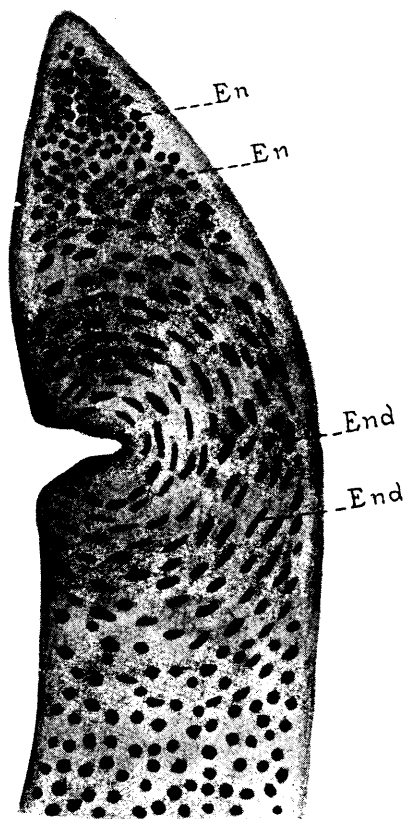


Fig. 30

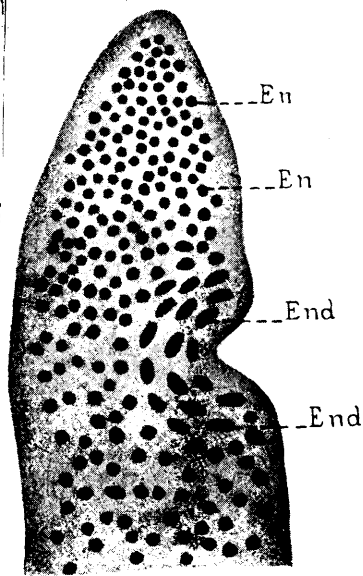


Fig. 31

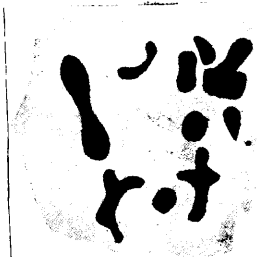


Fig. 33

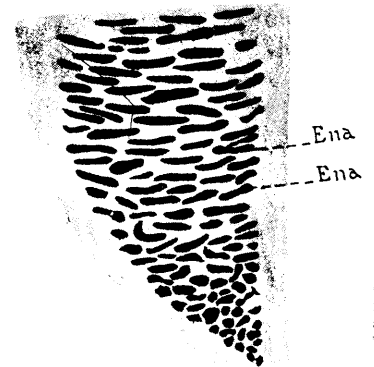


Fig. 32

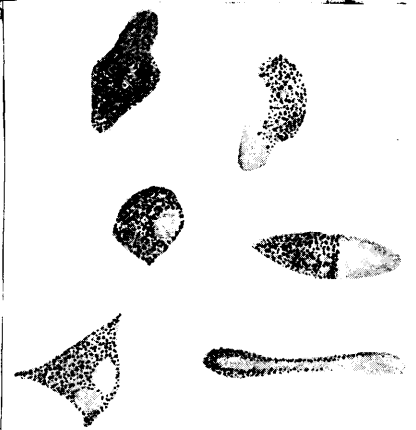


Fig. 34



Fig. 35

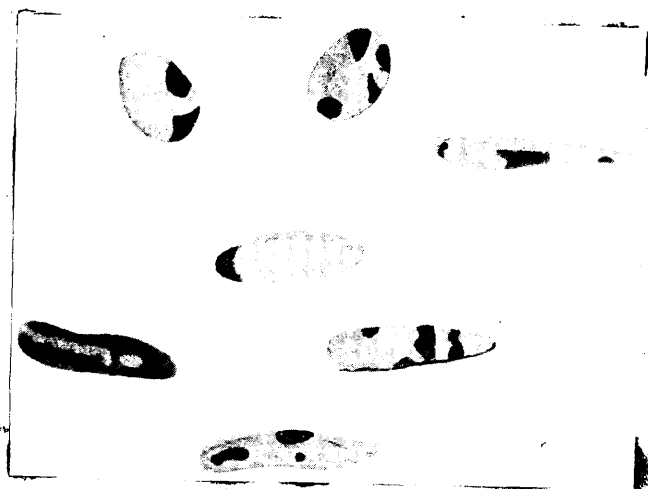


Fig. 36

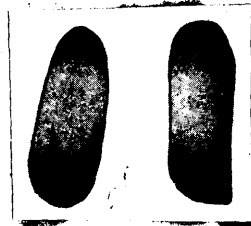


Fig. 37

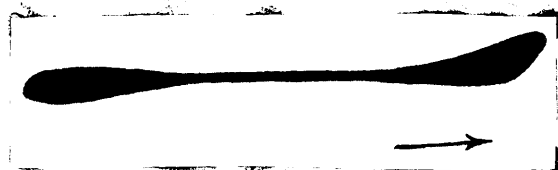


Fig. 38

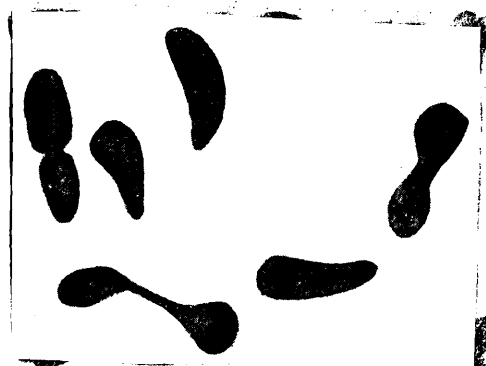


Fig. 39

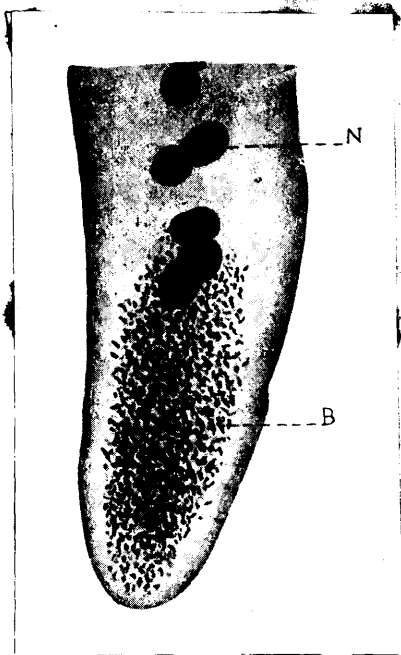


Fig. 40

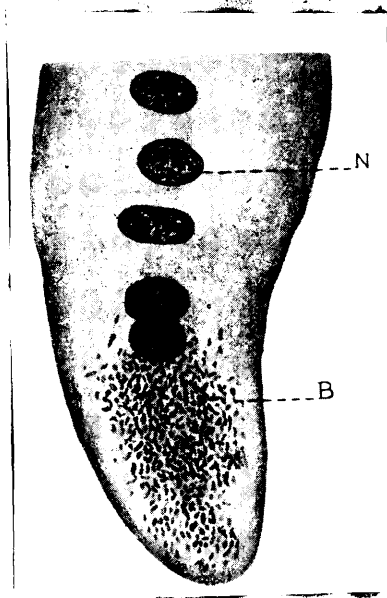


Fig. 41

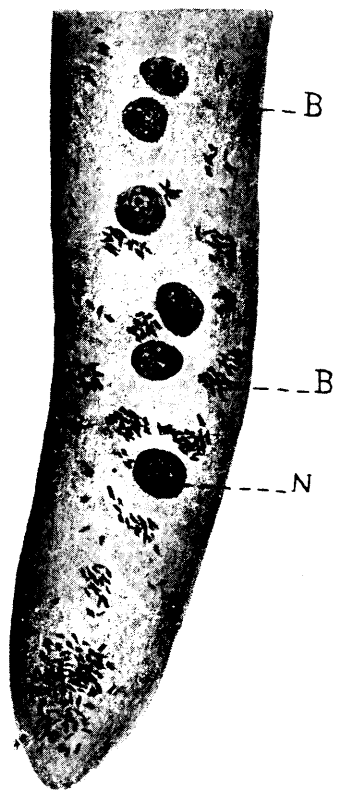


Fig. 42

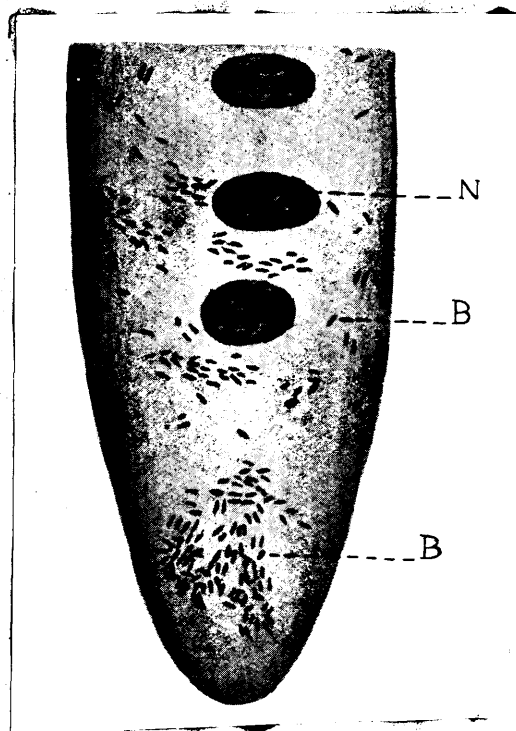


Fig. 43